

09/582337

PCT/JP98/05697

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

20.01.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1997年12月25日

EAKU

出 願 番 号
Application Number:

平成 9年特許願第367699号

出 願 人
Applicant(s):

日本たばこ産業株式会社

REC'D 12 MAR 1999

WIPO PCT

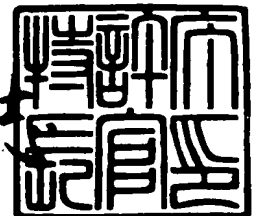
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 2月26日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

山 建 佐 平



出証番号 出証特平11-3009409

【書類名】 特許願
【整理番号】 J97-0135
【提出日】 平成 9年12月25日
【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 16/28
C07K 17/00
A61K 39/395
C12N 5/12
C12P 21/08
G01N 33/53
G01N 33/577

【発明の名称】 結合組織成長因子に対するモノクローナル抗体

【請求項の数】 39

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 玉谷 卓也

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 手塚 克成

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 坂本 信二

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市津島中一丁目3番 RB503

【氏名】 滝川 正春

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代表者】 水野 勝

【代理人】

【識別番号】 100100217

【弁理士】

【氏名又は名称】 大東 輝雄

【手数料の表示】

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 原寄託についての受託証の写し 2

【包括委任状番号】 9307386

【書類名】 明細書

【発明の名称】 結合組織成長因子に対するモノクローナル抗体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の（a）乃至（d）のいずれかに記載の性質を有することを特徴とする哺乳動物の結合組織成長因子（CTGF）に反応性を有するモノクローナル抗体：

（a）ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有する；

（b）ヒト及びマウスのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つラットのCTGFに反応性を有しない；

（c）マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒトのCTGFに反応性を有しない；または

（d）ヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T（ATCC CRL1573）とヒトのCTGFまたはマウスのCTGFとの結合を阻害する。

【請求項2】 モノクローナル抗体が、下記の（a）乃至（d）のいずれかに記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1に記載のモノクローナル抗体：

（a）ヒトのCTGFをマウスに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有するモノクローナル抗体；

（b）マウスのCTGFをハムスターに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有するモノクローナル抗体；

（c）マウスのCTGFをラットに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有するモノクローナル抗体；または

（d）マウスのCTGFをラットに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒトのCTGFに反応性を有しないモノクローナル抗体。

【請求項3】 モノクローナル抗体が、下記の（a）または（b）に記載の

モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項2に記載のモノクローナル抗体：

(a) ヒトのCTGFをマウスに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL1573) とヒトのCTGFとの結合を阻害するモノクローナル抗体；または

(b) マウスのCTGFをラットに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、ヒトのCTGFに反応性を有せず、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL1573) とマウスのCTGFとの結合を阻害するモノクローナル抗体。

【請求項4】 ヒト、マウス、またはラットのCTGFのいずれかに反応性を有するヒトモノクローナル抗体。

【請求項5】 ヒトモノクローナル抗体が、ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項4に記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項6】 ヒトモノクローナル抗体が、ヒトのCTGFに反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL1573) とヒトのCTGFとの結合を阻害するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項5に記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項7】 ヒトモノクローナル抗体が、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に由来するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項4乃至請求項6のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項8】 ヒトモノクローナル抗体が、ヒトのCTGFを、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫することにより得られるモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項7に記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項9】 トランスジェニック非ヒト哺乳動物が、トランスジェニックマウスであることを特徴とする請求項4乃至請求項8のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項20】 不溶性担体が、フィルター若しくはメンブレン、またはア

フィニティーカラムクロマトグラフィーに用いられる不溶性担体であることを特徴とする請求項18に記載の抗体固定化不溶性担体。

【請求項21】 請求項1乃至請求項10または請求項13若しくは請求項14のいずれかに記載のモノクローナル抗体を、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識してなる標識抗体。

【請求項22】 標識物質が、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、または放射性同位体であることを特徴とする請求項21に記載の標識抗体。

【請求項23】 請求項1乃至請求項10または請求項13若しくは請求項14のいずれかに記載のモノクローナル抗体、請求項18若しくは請求項19に記載の抗体固定化不溶性担体、及び請求項21若しくは請求項22に記載の標識抗体からなる群から選ばれる少なくともいずれか1つのモノクローナル抗体、抗体固定化不溶性担体または標識抗体を含んでなることを特徴とする哺乳動物のCTGFの検出または定量に用いられるキット。

【請求項24】 請求項18若しくは請求項19に記載の抗体固定化不溶性担体、及び請求項21若しくは請求項22に記載の標識抗体を含んでなることを特徴とする請求項23に記載の哺乳動物のCTGFの検出または定量に用いられるキット。

【請求項25】 請求項1乃至請求項10または請求項13若しくは請求項14のいずれかに記載のモノクローナル抗体、請求項18若しくは請求項19に記載の抗体固定化不溶性担体、及び請求項21若しくは請求項22に記載の標識抗体からなる群から選ばれる少なくともいずれか1つのモノクローナル抗体、抗体固定化不溶性担体、または標識抗体を用いることを特徴とするイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する方法。

【請求項26】 少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する請求項25に記載の方法：

(a) 請求項18または請求項19に記載の抗体固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程；及び

(b) 該抗体固定化不溶性担体と該試料中に含まれる哺乳動物のCTGFとの結合により形成される抗原抗体複合体に、請求項21または請求項22に記載の標識抗体を反応せしめる工程。

【請求項27】 少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する請求項25に記載の方法：

(a) 請求項21または請求項22に記載の標識抗体と、試料を反応せしめる工程；及び

(b) 該標識抗体と試料中に含まれる哺乳動物のCTGFとの結合により形成される抗原抗体複合体に、請求項18または請求項19に記載の抗体固定化不溶性担体を反応せしめる工程。

【請求項28】 少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する請求項25に記載の方法：

(a) 請求項18若しくは請求項19に記載の抗体固定化不溶性担体、請求項21若しくは請求項22に記載の標識抗体、及び試料を含む混合物を反応せしめる工程。

【請求項29】 少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する請求項25に記載の方法：

(a) 請求項18または請求項19に記載の抗体固定化不溶性担体に、試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質を反応せしめる工程。

【請求項30】 少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する請求項25に記載の方法：

(a) 試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質との混合物に、請求項1乃至請求項10または請求項13若しくは請求項14のいずれかに記載のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；及び

(b) 該試料中に含まれる哺乳動物のCTGF若しくは該標識された哺乳動物のCTGFの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗

原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

【請求項31】 少なくとも下記（a）乃至（c）の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する請求項25に記載の方法：

（a）試料に、請求項1乃至請求項10または請求項13若しくは請求項14のいずれかに記載のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；

（b）（a）の工程を行った反応系に、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質を反応せしめる工程；及び

（c）該試料中に含まれる哺乳動物のCTGF若しくは該標識された哺乳動物のCTGFの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

【請求項32】 請求項18または請求項20に記載の抗体固定化不溶性担体を含んでなる哺乳動物のCTGFの分離または精製に用いられるキット。

【請求項33】 請求項18または請求項20に記載の抗体固定化不溶性担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いることを特徴とする哺乳動物のCTGFを分離または精製する方法。

【請求項34】 アフィニティークロマトグラフィーがアフィニティークラムクロマトグラフィーである請求項33に記載の哺乳動物のCTGFの精製方法。

【請求項35】 請求項1乃至請求項10または請求項13若しくは請求項14のいずれかに記載のモノクローナル抗体、及び薬学的に許容されうる担体とを含んでなる医薬組成物。

【請求項36】 ヒトのCTGFをコードするDNAが、内在性遺伝子座に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニックマウス。

【請求項37】 配列番号1に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するラットのCTGF。

【請求項38】 配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するラットのCTGFをコードするDNA。

【請求項39】 DNAが、配列番号2に記載される塩基配列中の塩基番号213乃至1256迄の塩基配列を含むことを特徴とする請求項38に記載のDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、哺乳動物の結合組織成長因子 (Connective Tissue Growth Factor、CTGF) に反応性を有するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を固定化してなる抗体固定化不溶性担体、該モノクローナル抗体を標識物質で標識してなる標識抗体、哺乳動物のCTGFの検出、定量、分離または精製に用いられるキット、哺乳動物のCTGFを検出、定量、分離または精製する方法、該モノクローナル抗体を含んでなる医薬組成物、トランスジェニックマウス、ラットのCTGFポリペプチド、ラットのCTGFをコードするDNA、及びラットのCTGFに反応性を有する抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】

組織傷害における組織の再生は、傷害部位に移入したマクロファージ等の食食細胞等による不用の組織片や細胞片あるいは細菌等の除去、血管系の復元、並びにそれに続く新しい組織との置換を経て行われる。この組織の再生、修復の過程においては、該再生・修復の過程で出現するマクロファージや好中球が産生するトランスフォーミング増殖因子 β (Transforming Growth Factor β (TGF- β)) が最初の調節因子として働くことが明らかとなっている。

TGF- β の機能は多彩であり、間葉細胞の増殖誘導、血管内皮細胞及び上皮細胞の増殖抑制だけでなく、結合組織細胞からの細胞外マトリックス (Extracellular Matrix (ECM)) の産生を調節する機能を有することが知られている。

【0003】

前記TGF- β で刺激し増殖誘導が見られる間葉細胞の培養上清においては、血小板由来増殖因子 (Platelet-derived Growth Factor (PDGF)) や結合組織成長因子 (Connective Tissue Growth Factor (CTGF); Hcs 24とも呼ぶ) の産

生の増加が観察されることから、 $TGF-\beta$ による細胞増殖誘導活性は、それらの他の制御因子により間接的に発揮されるものであると考えられている。

【0004】

CTGFについては、ヒト及びマウスのCTGFが既に同定されており（なお、ラットのCTGFの同定については、未だ何ら報告されていない。）、それらの物理化学的及び生物学的性状の解析が進められてきている（[ヒトCTGF] J. Cell Biology, Vol.114, No.6, p.1285-1294, 1991; Int. J. Biochem. Cell Biol., Vol.29, No.1, p.153-161, 1997; Circulation, Vol.95, No.4, p.831-839, 1997; Cell Growth Differ., Vol.7, No.4, p.469-480, 1996; J. Invest. Dermatol., Vol.106, No.4, p.729-733, 1996; J. Invest. Dermatol., Vol.105, No.2, p.280-284, 1995; J. Invest. Dermatol., Vol.105, No.1, p.128-132, 1995; 及び国際特許出願公開W096/38172号公報。[マウスCTGF (Fisp12)] 特開平5-255397号公報、Cell Growth Differ., Vol.2, No.5, p.225-233, 1991; FEBS Letters, Vol.327, No.2, p.125-130, 1993; 及びDNA Cell Biol., Vol.10, No.4, p.293-300, 1991）。

【0005】

CTGFは、分子量約38 kDを有するシステイン残基に富んだ分泌型糖タンパクであり、その生合成及び分泌は $TGF-\beta$ より誘導されることが明らかにされている。CTGFは、 $TGF-\beta$ による産生誘導を受ける点、PDGF受容体に結合する点、間葉細胞系の増殖を誘導する点、線維芽細胞や上皮細胞から産生されるという点等でPDGFと類似の性質を有するが、アミノ酸配列相同性はほとんど有さない全く異なる分子である（The Journal of Cell Biology, Vol.114, No.6, p.1287-1294, 1991及びMolecular Biology of the Cell, Vol.4, p.637-645, 1993）。

【0006】

CTGFの生理学的機能及び疾患との関連性についての詳細は未だ完全に明らかにされてはいないものの、CTGFの $TGF-\beta$ による産生誘導、種々の疾患患者の組織及び細胞におけるCTGFのmRNAの有意な発現（Int. J. Biochem. Cell Biol., Vol.29, No.1, p.153-161, 1997; Circulation, Vol.95, No.4,

p.831-839, 1997; J. Invest. Dermatol., Vol.106, No.4, p.729-733, 1996; J. Invest. Dermatol., Vol.105, No.2, p.128-132, 1995; J. Cell Physiol., Vol.165, No.3, p.556-565, 1995及びKidney Int., Vol.48, No.2, p.5001-5009, 1995など)、並びにCTGFの血管内皮細胞の遊走及び増殖の促進に関する知見(J. Cell. Biol., Vol.114, No.6, p.1285-1294, 1991; Exp. Cell Res., Vol.1233, p.63-77, 1997; 齒科基礎医学会誌、第38巻、増刊、第463頁、PD0187、1996及び第69回日本生化学会要旨、第683頁、1P0535、1996など)等から、CTGFが種々疾患の発症及び／または進行に関与する可能性が示唆され初めてきている。

【0007】

具体的疾患の特定については、今後の研究展開及び研究結果を待たなければならないが、CTGFは、例えば、癌、動脈硬化症、皮膚疾患（例えば、乾癬、強皮症、アトピー、ケロイド）、腎疾患、関節炎（例えば、慢性関節リウマチ）、各種線維症（動脈硬化、肝硬変、関節炎、強皮症、ケロイド、腎線維化、及び肺線維症等で見られる組織線維化）等の幅広い範囲の疾患の発症及び／または進行に関与するのではないかと予測することができる。

【0008】

このような各種疾患とCTGFとの係わりの解明においては、種々の疾患に罹患している患者及び疾患哺乳動物の体液（血清など）中に含まれるCTGF及び／またはその断片を検出及び定量し、その値を、正常な生体（健常人、正常マウス、正常ラット、及び正常ウサギ等の哺乳動物）における測定値と比較することが、有効な一般的な手段である。

CTGFのような分泌性タンパクの検出あるいは定量には、検出しようとする分泌性タンパクに対する抗体（特には、モノクローナル抗体）を用いた抗原抗体反応に基づく免疫学的測定方法、具体的には、ラジオイムノアッセイ（RIA）あるいはエンザイムイムノアッセイ（EIA、ELISA）等のイムノアッセイが、最も簡便で有用な方法として汎用されている。

【0009】

同様に、CTGFの検出及び定量においても、このようなイムノアッセイによ

る検出方法及び定量方法、該定量方法の確立に必要とされるCTGFに対するモノクローナル抗体の作製、開発が必要となる。しかしながら、CTGFに対する抗体については、抗血清の作製についての報告はあるものの (Exp. Cell Res., Vol.233, p.63-77, 1997; Cell Growth Differ., Vol.8, No.1, p.61-68, 1997; 及び第69回日本生化学会要旨、第683頁、1P0534, 1996)、モノクローナル抗体、とりわけCTGFに対する高い親和性及び／またはCTGFの活性を中和する能力を有する機能的なモノクローナル抗体については未だ報告されておらず、イムノアッセイによるCTGFの定量系も全く提供されていない。

また、前記のようなCTGFの活性を中和する能力を有するモノクローナル抗体は、そのようなイムノアッセイにおける構成要素としてだけでなく、前述のようなCTGFの分泌に起因する各種疾患の治療及び／または予防における抗体医薬品として有用であるが、該抗体医薬品として使用可能なモノクローナル抗体についても、全く報告されていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

従って、前記のような種々疾患の発症及び／または進行に関連する可能性を有するCTGFの生物学的機能及び該CTGFと各種疾患との因果関係の解明、並びにCTGFに起因する疾患の治療及び予防における医薬品の有効成分として使用可能な、ヒト、マウス、ラット及びウサギ等の各種哺乳動物のCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体の開発が望まれている。特に、CTGFの機能及びCTGFと各種疾患との関係の解明において必要な手段であるCTGFのイムノアッセイにおいて用いられるモノクローナル抗体としては、該CTGFに対する所望の親和性、CTGFの生物学的活性を中和する能力、及び／または種々の哺乳動物に対する所望の交叉反応性 (cross reactivity) を有するモノクローナル抗体の開発が求められている。さらに、該種々疾患に罹患している患者の治療及び／または予防に用いられるモノクローナル抗体としては、該中和活性に加え、該患者に対する抗原性を低減または消失させたモノクローナル抗体の開発が求められている。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上述のような社会的ニーズを満たすために、各種哺乳動物のCTGFに対するモノクローナル抗体に関して鋭意研究した結果、種々の哺乳動物に由来するCTGFを免疫原として用いることにより、抗原特異性、抗原親和性、中和活性、及び交叉反応性等の性質の点で、各々異なる特性を有する種々の哺乳動物のCTGFに対する種々のモノクローナル抗体を作製することに成功した。

また、遺伝子組換え技術を用いてヒトの抗体を産生するように作製したトランスジェニックマウスをヒトのCTGFで免疫することによって、ヒトCTGFに対する種々のヒトモノクローナル抗体を作製することに世界に先んじて初めて成功した。

【0012】

さらに、前者の種々のモノクローナル抗体を用いて構築した種々のイムノアッセイ系により、種々哺乳動物（ヒト、マウス、ラット及びウサギ等）の体液（血清等）中のCTGFを、インタクトな状態で簡便かつ高感度で定量できることを見出し本発明を完成するに到った。

また、後者のヒト抗体が、ヒトCTGFの活性を有意に中和する活性を見出し、本願発明を完成するに到った。これらのヒト抗体は、マウス由来の抗体等の非ヒト哺乳動物由来の抗体からなる抗体医薬品の治療上の大きな問題点（副作用）であったヒトに対する抗原性を全く有しないことから、抗体の医薬品としての価値を劇的に増大させるものである。

【0013】

即ち、本発明は、ヒト、マウス及びラット等の各種哺乳動物の体液中に含まれるCTGFを検出及び定量するためのイムノアッセイにおける構成要素として、並びに患者の治療及び予防における医薬品として有用な種々の特性を有する各種哺乳動物に対するモノクローナル抗体を、本発明の分野において初めて提供するものである。

さらに、本発明は、そのようなCTGFに対する種々のモノクローナル抗体を用いることによるCTGFのイムノアッセイ方法及びアッセイキットを初めて提

供するものである。

【0014】

本発明のモノクローナル抗体を用いたイムノアッセイにより、ヒトは勿論、種々哺乳動物（ヒト、マウス、ラット及びウサギなど）の正常な生体並びに疾患に罹患している生体の体液中に存在するCTGFを、インタクト（intact）な状態で簡便かつ高感度で検出及び定量できる。

また、本発明のヒトCTGFに対するモノクローナル抗体は、ヒトに対する抗原性を惹起することなく、CTGFに起因する種々の疾患の治療及び予防するための医薬品として極めて有用である。

【0015】

即ち、本発明の下記のと通りの発明である。

（1）下記の（a）乃至（d）のいずれかに記載の性質を有することを特徴とする哺乳動物の結合組織成長因子（CTGF）に反応性を有するモノクローナル抗体：

（a）ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有する；

（b）ヒト及びマウスのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つラットのCTGFに反応性を有しない；

（c）マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒトのCTGFに反応性を有しない；または

（d）ヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T（ATCC CRL1573）とヒトのCTGFまたはマウスのCTGFとの結合を阻害する。

（2）モノクローナル抗体が、下記の（a）乃至（d）のいずれかに記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする前記（1）に記載のモノクローナル抗体：

（a）ヒトのCTGFをマウスに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有するモノクローナル抗体；

（b）マウスのCTGFをハムスターに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有するモ

ノクローナル抗体；

(c) マウスのCTGFをラットに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有するモノクローナル抗体；または

(d) マウスのCTGFをラットに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒトのCTGFに反応性を有しないモノクローナル抗体。

(3) モノクローナル抗体が、下記の(a)または(b)に記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(2)に記載のモノクローナル抗体：

(a) ヒトのCTGFをマウスに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL1573) とヒトのCTGFとの結合を阻害するモノクローナル抗体；または

(b) マウスのCTGFをラットに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、ヒトのCTGFに反応性を有せず、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL1573) とマウスのCTGFとの結合を阻害するモノクローナル抗体。

(4) ヒト、マウス、またはラットのCTGFのいずれかに反応性を有するヒトモノクローナル抗体。

(5) ヒトモノクローナル抗体が、ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(4)に記載のヒトモノクローナル抗体。

(6) ヒトモノクローナル抗体が、ヒトのCTGFに反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL1573) とヒトのCTGFとの結合を阻害するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(5)に記載のヒトモノクローナル抗体。

(7) ヒトモノクローナル抗体が、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に由来するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(4)乃至前記(6)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体。

(8) ヒトモノクローナル抗体が、ヒトのCTGFを、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫することにより得られるモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(7)に記載のヒトモノクローナル抗体。

(9) トランスジェニック非ヒト哺乳動物が、トランスジェニックマウスであることを特徴とする前記(4)乃至前記(8)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体。

(10) ラットのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体。

(11) 国際寄託番号FERM BP-6208で識別されるハイブリドーマ。

(12) 国際寄託番号FERM BP-6209で識別されるハイブリドーマ。

(13) 国際寄託番号FERM BP-6208で識別されるハイブリドーマから産生され、ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体または該モノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体。

(14) 国際寄託番号FERM BP-6209で識別されるハイブリドーマから産生され、ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体または該モノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体。

(15) 可変領域が前記(2)、前記(3)、前記(13)または前記(14)のいずれかに記載のモノクローナル抗体由来の可変領域であり、かつ定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒトのCTGFに反応性を有する組換えキメラモノクローナル抗体。

(16) 超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が前記(2)、前記(3)、前記(13)または前記(14)のいずれかに記載のモノクローナル抗体由来の相補性決定領域であり、超可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の枠組領域であり、かつ定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒトのCTGFに反応性を有する組換えヒト型モノクローナル抗体

(17) 前記(1)乃至前記(10)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

(18) 前記(1)乃至前記(10)または前記(13)若しくは前記(14)

）のいずれかに記載のモノクローナル抗体が固定化されていることを特徴とする抗体固定化不溶性担体。

（１９）不溶性担体が、プレート、試験管、チューブ、ビーズ、ボール、フィルター及びメンブレンからなる群から選ばれる不溶性担体であることを特徴とする前記（１８）に記載の抗体固定化不溶性担体。

（２０）不溶性担体が、フィルター若しくはメンブレン、またはアフィニティーカラムクロマトグラフィーに用いられる不溶性担体であることを特徴とする前記（１８）に記載の抗体固定化不溶性担体。

（２１）前記（１）乃至前記（１０）または前記（１０）若しくは前記（１４）のいずれかに記載のモノクローナル抗体を、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識してなる標識抗体。

（２２）標識物質が、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、または放射性同位体であることを特徴とする前記（２１）に記載の標識抗体。

（２３）前記（１）乃至前記（１０）または前記（１３）若しくは前記（１４）のいずれかに記載のモノクローナル抗体、前記（１８）若しくは前記（１９）に記載の抗体固定化不溶性担体、及び前記（２１）若しくは前記（２２）に記載の標識抗体からなる群から選ばれる少なくともいずれか１つのモノクローナル抗体、抗体固定化不溶性担体または標識抗体を含んでなることを特徴とする哺乳動物のＣＴＧＦの検出または定量に用いられるキット。

（２４）前記（１８）若しくは前記（１９）に記載の抗体固定化不溶性担体、及び前記（２１）若しくは前記（２２）に記載の標識抗体を含んでなることを特徴とする前記（２３）に記載の哺乳動物のＣＴＧＦの検出または定量に用いられるキット。

（２５）前記（１）乃至前記（１０）または前記（１３）若しくは前記（１４）のいずれかに記載のモノクローナル抗体、前記（１８）若しくは前記（１９）に記載の抗体固定化不溶性担体、及び前記（２１）若しくは前記（２２）に記載の標識抗体からなる群から選ばれる少なくともいずれか１つのモノクローナル抗体、抗体固定化不溶性担体、または標識抗体を用いることを特徴とするイムノア

ッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する方法。

(26) 少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する前記(25)に記載の方法:

(a) 前記(18)または前記(19)に記載の抗体固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程; 及び

(b) 該抗体固定化不溶性担体と該試料中に含まれる哺乳動物のCTGFとの結合により形成される抗原抗体複合体に、前記(21)または前記(22)に記載の標識抗体を反応せしめる工程。

(27) 少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する前記(25)に記載の方法:

(a) 前記(21)または前記(22)に記載の標識抗体と、試料を反応せしめる工程; 及び

(b) 該標識抗体と試料中に含まれる哺乳動物のCTGFとの結合により形成される抗原抗体複合体に、前記(18)または前記(19)に記載の抗体固定化不溶性担体を反応せしめる工程。

(28) 少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する前記(25)に記載の方法:

(a) 前記(18)若しくは前記(19)に記載の抗体固定化不溶性担体、前記(21)若しくは前記(22)に記載の標識抗体、及び試料を含む混合物を反応せしめる工程。

(29) 少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する前記(25)に記載の方法:

(a) 前記(18)または前記(19)に記載の抗体固定化不溶性担体に、試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質を反応せしめる工程。

(30) 少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する前記(25)に記載の方法:

(a) 試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能な

シグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質との混合物に、前記(1)乃至前記(10)または前記(13)若しくは前記(14)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；及び

(b) 該試料中に含まれる哺乳動物のCTGF若しくは該標識された哺乳動物のCTGFの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

(31) 少なくとも下記(a)乃至(c)の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する前記(25)に記載の方法：

(a) 試料に、前記(1)乃至前記(10)または前記(13)若しくは前記(14)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；

(b) (a)の工程を行った反応系に、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質を反応せしめる工程；及び

(c) 該試料中に含まれる哺乳動物のCTGF若しくは該標識された哺乳動物のCTGFの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

(32) 前記(18)または前記(20)に記載の抗体固定化不溶性担体を含んでなる哺乳動物のCTGFの分離または精製に用いられるキット。

(33) 前記(18)または前記(20)に記載の抗体固定化不溶性担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いることを特徴とする哺乳動物のCTGFを分離または精製する方法。

(34) アフィニティークロマトグラフィーがアフィニティークラムクロマトグラフィーである前記(33)に記載の哺乳動物のCTGFの精製方法。

(35) 前記(1)乃至前記(10)または前記(13)若しくは前記(14)のいずれかに記載のモノクローナル抗体、及び薬学的に許容されうる担体とを含んでなる医薬組成物。

(36) ヒトのCTGFをコードするDNAが、内在性遺伝子座に組み込まれ

ていることを特徴とするトランスジェニックマウス。

(37) 配列番号1に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するラットのCTGF。

(38) 配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するラットのCTGFをコードするDNA。

(39) DNAが、配列番号2に記載される塩基配列中の塩基番号213乃至1256迄の塩基配列を含むことを特徴とする前記(38)に記載のDNA。

【0016】

【発明の実施の形態】

以下、本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明における「哺乳動物」とは、ヒト、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモット等を意味し、好ましくは、ヒト、ウサギ、ラット、ハムスターまたはマウスであり、特に好ましくは、ヒト、ラット、ハムスターまたはマウスである。

【0017】

本発明でいう「結合組織成長因子 (Connective Tissue Growth Factor (CTGF))」とは、前記哺乳動物のCTGFであり、例えば、前述に記載したとおりの既報に報告される構造及び機能を有するヒト及びマウスのCTGFを包含する（例えば、The Journal of Cell Biology, Vol.114, No.6, p.1287-1294, 1991、Molecular Biology of the Cell, Vol.4, p.637-645, 1993、及びBiochem. Biophys. Res. Comm., Vol.234, p.206-210, 1997など）。また、本願発明の1つであるラットのCTGFも包含することは言うまでもない。

さらに、後述する本願発明でいう「モノクローナル抗体」が、天然型のタンパク一次構造（アミノ酸配列）を有するCTGFに反応性を有する限り、本発明でいう該CTGFには、該天然型のタンパク一次構造と実質的に同一のアミノ酸配列を有するCTGFも包含する。

【0018】

本発明において使用される、「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」なる用

語は、天然型のCTGFと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が置換、欠失及び／または修飾されているアミノ酸配列を有するタンパク、並びに該アミノ酸配列に、複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するタンパクをも包含することを意味する。さらに、そのような置換、欠失、修飾及び付加の複数の組み合わせの場合であってもよい。

本発明におけるCTGFは、遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

【0019】

また、本発明におけるCTGFには、該CTGFの「一部」も包含される。ここで「CTGFの一部」とは、CTGFのアミノ酸配列中の任意の部分配列を含むポリペプチドを意味し、具体的には5乃至100アミノ酸残基を有するCTGFペプチドフラグメント、より具体的には5乃至50アミノ酸残基を有するCTGFペプチドフラグメント、さらに具体的には5乃至30アミノ酸残基を有するペプチドフラグメントが包含される。好ましくは、CTGFがその受容体と結合若しくは相互作用する部位（受容体結合部位など）またはCTGFがその生物学的機能を発揮するために必要な部位（活性部位など）を含むCTGFの部分構造である。

これらのポリペプチド（部分構造、フラグメント）は、後述する当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法に従って、遺伝子組換え技術または化学的合成法により製造することもできるし、また細胞培養方法により単離したCTGFをタンパク分解酵素等を用いて適切に切断することにより製造することができる。

【0020】

本発明における「モノクローナル抗体」とは、哺乳動物の結合組織成長因子（CTGF）またはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体である。具体的には、前記発明（1）乃至前記発明（10）または前記発明（13）若しくは前

記発明（14）のいずれかに記載される特徴を有するモノクローナル抗体である。さらに具体的には、図1に記載される様々な特性を有する各種のモノクローナル抗体である。

本発明の「モノクローナル抗体」は、結合組織成長因子（天然体、組換体、合成物、細胞培養上清を含む）若しくはその一部を抗原（免疫源）として用い、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体及びヒト型抗体（CDR-grafted抗体）、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体も包含する。

またモノクローナル抗体の場合には、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体をも包含する。好ましくは、IgGまたはIgMである。

【0021】

本発明で言うポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、哺乳動物（後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む）、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

【0022】

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述の結合組織成長因子（CTGF；天然体、組換体、合成物、細胞培養

上清を含む)若しくはその一部を免疫原として、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント (Freund's Adjuvant) とともに、非ヒト哺乳動物、具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター(後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む)の皮下内、筋肉内、静脈内、フットパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。免疫を施す回数及び時間的インターバルは、使用する免疫原の性質などにより、適宜変更することができる。

【0023】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（ネイチャー(Nature)、第256巻、第495～第497頁、1975年）及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された非ヒト哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

【0024】

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ P3/X63-AG8.653 (6 5 3)、P3/NSI/1-Ag4-1 (N S - 1)、P3/X63-Ag8.U1 (P 3 U 1)、SP2/0-Ag14 (S p 2 / O、S p 2)、PAI、F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11あるいはCEM-T15を使用することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述のマウス免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を

、例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

【0025】

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。

インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

【0026】

基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含むことができる。

モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

【0027】

本発明における「キメラモノクローナル抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その可変領域が、非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ハムスターなど）のイムノグロブリン由来の可変領域であり、

かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、~~I g G (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)~~、I g M、I g A、I g D及びI g E等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明における組換えキメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトI g Gの定常領域である。

本発明におけるキメラモノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

【0028】

例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、第1.6巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性な V_H 遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に、ヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得した C_H 遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性な V_L 遺伝子（L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子）の下流にヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得した C_L 遺伝子（L鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

【0029】

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素（例えばEcoRI、HindIII等）を用いて消化し、電気泳動に付して（例えば0.7%アガロースゲル使

用) サザンブロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカーの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25M HCl溶液に15分間浸す。次いで、0.4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ペイキング(75℃、3時間)を行う。ペイキング終了後に、該フィルターを0.1×SSC/0.1%SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC/0.1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65℃で3～4時間処理する。

【0030】

次に、この中に³²P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を入れ、65℃で12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間(例えば、2×SSC-0.1%SDS溶液、室温、10分間)のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

上記サザンブロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定したDNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター(例えば、Charon 4A、Charon 28、λEMBL 3、λEMBL 4等)に組み込み、該ファージベクターで大腸菌(例えば、LE392、NM539等)を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリーを適当なプローブ(H鎖J遺伝子、L鎖(κ)J遺伝子等)を用いて、例えばベントンデイス法(サイエンス(Science)、第196巻、第180～第182頁、1977年)に従って、ブラークハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とする再配列されたV_H(VDJ)遺伝子あるいはV_L(VJ)遺伝子を含む遺伝子を得られていることを確認する。

【0031】

一方、キメラ化に用いるヒトC_H遺伝子及びヒトC_L遺伝子を別に単離する。例

えば、ヒト $I\gamma G1$ とのキメラ抗体を作製する場合には、 C_H 遺伝子である $C\gamma 1$ 遺伝子と C_L 遺伝子である $C\kappa$ 遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒト $C\gamma 1$ 遺伝子及びヒト $C\kappa$ 遺伝子に相当するマウス $C\gamma 1$ 遺伝子及びマウス $C\kappa$ 遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

【0032】

具体的には、例えば、クローン $I\gamma 146$ (プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第75巻、第4709～第4713頁、1978年) からの3kbの $HindIII-BamHI$ 断片とクローンMEP10 (プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第78巻、第474～第478頁、1981年) からの6.8kbの $EcoRI$ 断片をプローブとして用い、ヒトのラムダCharon 4A の $HaeIII-AluI$ ゲノムライブラリー (セル(Cell)、第15巻、第1157～第1174頁、1978年) 中から、ヒト $C\kappa$ 遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒト $C\gamma 1$ 遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞DNAを $HindIII$ で切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9kbのバンドを $\lambda 788$ に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

【0033】

このようにして単離されたマウス V_H 遺伝子とマウス V_L 遺伝子、及びヒト C_H 遺伝子とヒト C_L 遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウス V_H 遺伝子の下流にヒト C_H 遺伝子を、またマウス V_L 遺伝子の下流にヒト C_L 遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えば $pSV2gpt$ あるいは $pSV2neo$ 等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウス V_H 遺伝子/ヒト C_H 遺伝子とマウス V_L 遺伝子/ヒト C_L 遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

【0034】

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えばP3X63・Ag8・653細胞あるいはSP210細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。

このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

【0035】

本発明における「ヒト型モノクローナル抗体 (CDR-grafted抗体)」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が非ヒト哺乳動物 (マウス、ラット、ハムスターなど) のモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

【0036】

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域 (Complementarity-determining residue; CDR1、CDR2、CDR3) を指し、また可変領域の枠組領域とは、該3つ相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された4つの領域 (Framework; FR1、FR2、FR3、FR4) を指す。

換言すれば、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明におけるヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好

ましくは、ヒト IgG の定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

【0037】

本発明におけるヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換ヒト型モノクローナル抗体は、特表平4-506458号公報及び特開昭62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域をコードするヒトH鎖遺伝子と、前マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。

【0038】

単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスL鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子／ヒトH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子／ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノクローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

【0039】

本発明における「ヒトモノクローナル抗体」とは、イムノグロブリンを構成するH鎖の可変領域及びH鎖の定常領域並びにL鎖の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。

ヒト抗体は、常法に従って、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。

例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; 特表平4-504365号公報; 特表平7-509137号公報; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年; 国際出願公開WO94/25585号公報; Nature, Vol.368, p.856-859, 1994; 及び特表平6-500233号公報などに記載の方法に従って作製することができる。

また、昨今開発された技術であるトランスジェニックなウシやブタのミルク中からヒト由来タンパクを製造方法を適用することも可能である(日系サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁)。

【0040】

本発明における「モノクローナル抗体」には、該モノクローナル抗体の「一部」も包含される。該「モノクローナル抗体の一部」とは、前述の本発明におけるモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (variable fragment of antibody)、 sFv 、 $dsFv$ (disulphide stabilised Fv) あるいは dAb (single domain antibody) である(エキスパート・オピニオン・オン・テラピューティック・パテンツ(Exp. Opin. Ther. Patents), 第6巻, 第5号, 第441～456頁, 1996年)。

【0041】

ここで、「 $F(ab')_2$ 」及び「 Fab' 」とは、イムノグロブリン(モノクローナル抗体)を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されて V_L (L鎖可変領域)と C_L (L鎖定常領域)からなるL鎖、及びV

H (H鎖可変領域) と $C_H\gamma 1$ (H鎖定常領域中の $\gamma 1$ 領域) とからなる H鎖フラグメントが C末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な 2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら 2つの相同な抗体フラグメントを各々 $Fa b'$ という。また $I-g G$ をペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の 2本の H鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記 2つの $Fa b'$ がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$ という。

【0042】

本発明における「哺乳動物由来の抗血清」とは、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ブタあるいはウシ等の哺乳動物、好ましくはラット、モルモット、ウサギあるいはヤギに、前記本発明のモノクローナル抗体あるいは前記本発明の抗体フラグメントを、前述モノクローナル抗体の製造方法で述べたような方法で免疫して製造される該本発明のモノクローナル抗体または抗体フラグメントに反応性を有する抗体を含む血清を意味する。

【0043】

本発明における「不溶性担体」とは、本発明のモノクローナル抗体若しくは抗体フラグメント、または試料（例えば、血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれる $CTGF$ を物理学的吸着あるいは化学的結合等によって担持させるための支持体を意味する。

例えば、(1) ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂あるいはナイロン樹脂等からなるプラスチックや、ガラス等に代表されるような水に不溶性の物質からなるプレート、試験管若しくはチューブ等の内容積を有するもの、ビーズ（特には、マイクロビーズ）、ボール、フィルター、あるいはメンブレン等、並びに (2) セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のようなアフィニティークロマトグラフィーに用いられる不溶性担体を挙げることができる。

【0044】

本発明の「抗体固定化不溶性担体」とは、前記のような不溶性担体上に、本発

明のモノクローナル抗体（または抗体フラグメント）が、物理的吸着あるいは化学的結合等によって担持された状態にある不溶性担体を意味する。これらの抗体固定化不溶性担体は、試料（例えば、血清や血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれるCTGFを検出、定量、分離または精製するために用いることができる。

該検出または定量の目的においては、前記（１）に例示した不溶性担体を用いることができ、とりわけ定量に用いる不溶性担体としては、操作の簡便性及び多数検体の同時処理の観点を考慮すると、例えば96穴マイクロタイタープレートあるいは48穴マイクロタイタープレート等の多数のウェル（Well、穴）を有するプラスチック等で作製されたマルチウェルマイクロタイタープレートを用いるのが好ましい。また、該分離または精製の目的においては、前記（１）に例示したフィルター若しくはメンブレンまたは前記（２）に例示した不溶性担体を用いることができる。

【0045】

本発明における「単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質」とは、それらを、前述のようなモノクローナル抗体抗体あるいはCTGFの標準物質に物理化学的結合等により結合させることによりそれらの存在を検出可能にするために用いられる物質を意味する。

具体的には、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジンあるいは放射性同位体等であり、さらに具体的には、ペルオキシダーゼ（例えば、horseradish peroxidase）、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンバク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 若しくは ^{131}I 等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、または化学発光物質が挙げられる。

【0046】

ここで、放射性同位体及び蛍光物質は、単独で検出可能なシグナルをもたらすことができる。一方、酵素、化学発光物質、ビオチン及びアビジンは、単独では検出可能なシグナルをもたらすことができないため、さらに1種以上の他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらす。例えば、酵素の場合には少なくとも基質が必要であり、酵素活性を測定する方法（比色法、蛍光法、生物発光法あるいは化学発光法等）に依存して種々の基質が用いられる。例えば、ペルオキシダーゼの場合には、基質として過酸化水素を用いる。また、ビオチンの場合には少なくともアビジンあるいは酵素修飾アビジンを反応させるのが一般的であるが、この限りではない。必要に応じてさらに該基質に依存する種々の発色物質が用いられる。

【0047】

本発明における「標識抗体」及び「標識された哺乳動物のＣＴＧＦの標準物質」とは、各々前記のような種々標準物質で標識されたモノクローナル抗体（または抗体フラグメント）及びＣＴＧＦを意味する。これらの標識抗体及び標識標準物質は、試料（例えば、血清や血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれるＣＴＧＦを検出、定量、分離または精製するために用いることができる。本発明においては、上記のいずれの標識物質をも使用可能であるが、検出感度あるいは定量感度の高さ及び操作の利便性の点を考慮すると、ペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識するのが好ましい。

【 0 0 4 8 】

ここで「CTGFの標準物質」とは、試料中に含まれる濃度（含量）未知のCTGFと対照的に、あらかじめ単離されているCTGFを意味し、アッセイの目的に応じて自由にその濃度をコントロールすることができる標品（スタンダード）を意味する。該標準物質は、例えば、検量線の作成に用いることができる。

【0049】

本発明における「イムノアッセイ」とは、抗原抗体反応の原理に基づき、試料（例えば、血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれる抗原の検出あるいは定量を行う方法を意味し、本発明においては、該抗原抗体反応における抗体が、本発明の哺乳動物のCTGFに反応性を有する前記のようなモノ

クローナル抗体（若しくはその抗体フラグメント）、前記のような抗体固定化不溶性担体（若しくは抗体フラグメント固定化不溶性担体）、または前記のような標識抗体（若しくは標識抗体フラグメント）から選ばれる一つ以上の該モノクローナル抗体（または抗体フラグメント）をであること、及び抗原が哺乳動物のCTGFであること以外は、これまでに知られているイムノアッセイをも適用することができる。

【0050】

具体的には、酵素免疫測定法（第3版、石川榮治ら編集、医学書院発行、1987年）に記載されているような、例えば、一抗体固相法、二抗体液相法、二抗体固相法、サンドイッチ法、EMIT法（Enzyme multiplied immunoassay technique）、エンザイムチャネリングアッセイ（Enzyme channeling immunoassay）、酵素活性修飾物質標識イムノアッセイ（Enzyme modulator mediated enzyme immunoassay、EMMIA）、酵素阻害物質標識イムノアッセイ（Enzyme inhibitor immunoassay）、イムノエンザイムメトリックアッセイ（Immunoenzymometric assay）、酵素活性増強イムノアッセイ（Enzyme enhanced immunoassay）あるいはプロキシマルリンケージイムノアッセイ（Proximal linkage immunoassay）等、さらには、特公平2-39747号公報に記載されているようなワンポット法を挙げることができる。

【0051】

本発明においては、このようなイムノアッセイを、目的に応じて適宜選択して用いることができるが、操作上の簡便性及び／または経済的な利便性、とりわけ臨床上での汎用性の点を考慮すると、サンドイッチ法、ワンポット法、一抗体固相法または二抗体液相法を用いるのが好ましく、より好ましくは、サンドイッチ法またはワンポット法である。特に好ましくは、本発明のモノクローナル抗体を、96穴マイクロプレートに代表されるような多数のウェルを有するマルチウェルマイクロプレートに固定化した抗体固定化不溶性担体と、酵素あるいはビオチンにより標識された標識抗体とを用いるサンドイッチ法、あるいは本発明のモノクローナル抗体を、マイクロビーズ等のビーズまたは微小なボールに固定化した抗体固定化不溶性担体と、酵素あるいはビオチンにより標識された標識抗体とを

用いるワンポット法である。

【0052】

特に好ましい態様において具体的な一例を挙げるならば、図1に記載のモノクローナル抗体である「8-64-6」または「13-51-2」をマイクロプレートまたはマイクロビーズに固定化した抗体固定化不溶性担体と、図1に記載されるモノクローナル抗体である「8-86-2」を酵素またはビオチンで標識した標識抗体との組合わせによるサンドイッチ法またはワンポット法である。

「8-64-6」を固定化した抗体固定化不溶性担体と、「8-86-2」を酵素またはビオチンで標識した標識抗体との組合わせによるイムノアッセイでは、ヒト及びマウスのCTGFを高感度で検出、定量することができる。また、「13-51-2」を固定化した抗体固定化不溶性担体と、「8-86-2」を酵素またはビオチンで標識した標識抗体との組合わせによるイムノアッセイでは、ラット（本願において初めて開示される）及びマウスのCTGFを高感度で検出、定量することができる。

【0053】

以下に、サンドイッチ法、ワンポット法、一抗体固相法及び二抗体液相法について詳述する。

サンドイッチ法は、前述の本発明の（26）で述べた方法、即ち、少なくとも下記（a）及び（b）の工程を含むイムノアッセイ法である。

- （a）本発明の抗体固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程；及び
- （b）該抗体固定化不溶性担体と該試料中に含まれる哺乳動物のCTGFとの結合により形成される抗原抗体複合体に、本発明の標識抗体を反応せしめる工程。

【0054】

本発明に即して、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロプレートに固定化した「抗体固定化マイクロプレート」を用い、また「標識抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-86-2」をペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識した「標識抗体」を用いて、ヒトまたはマウスのCTGFを定量する方法について具体的に説明すると、例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるもので

はない。

また、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「13-51-2」をマイクロプレートに固定化した「抗体固定化マイクロプレート」を用い、また「標識抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-86-2」をペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識した「標識抗体」を用いて下記と同様に操作することによって、マウスのCTGFだけでなくラット（本願において初めて開示される）のCTGFも定量することができる。

【0055】

（工程1）本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロプレートに固定化し、抗体固定化マイクロプレートを作製する工程；

（工程2）該抗体固定化マイクロプレートにヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、該マイクロプレート上に固定化されているモノクローナル抗体と試料とを反応させる工程；

（工程3）該マイクロプレートを洗浄し未反応の試料を該マイクロプレートから取り除く工程；

（工程4）本発明のモノクローナル抗体「8-86-2」をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識抗体を作製する工程；

（工程5）工程3で洗浄されたマイクロプレートに、該標識抗体を加え、該マイクロプレート上に固定化されたモノクローナル抗体と試料中に含まれるヒトまたはマウスのCTGFとが反応して形成される抗原抗体複合体に該標識抗体を反応させる工程；

【0056】

（工程6）マイクロプレートを洗浄し、未反応の標識抗体を、該マイクロプレートから取り除く工程；

（工程7）工程6で洗浄されたマイクロプレートに、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程5でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程5でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる

工程；

(工程8) 工程7で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる

工程；

(工程9) マイクロプレートに反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程10) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0057】

ワンポット法は、前述の本発明の(26)、(27)または(28)で各々述べた方法である。

即ち、第1は、少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の抗体固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程；及び

(b) 該抗体固定化不溶性担体と該試料中に含まれる哺乳動物のCTGFとの結合により形成される抗原抗体複合体に、本発明の標識抗体を反応せしめる工程。

【0058】

第2は、少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の標識抗体と、試料を反応せしめる工程；及び

(b) 該標識抗体と試料中に含まれる哺乳動物のCTGFとの結合により形成される抗原抗体複合体に、本発明の抗体固定化不溶性担体を反応せしめる工程。

【0059】

第3は、少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の抗体固定化不溶性担体、本発明の標識抗体、及び試料を含む混合物を反応せしめる工程。

本発明に即して、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロビーズに固定化した「抗体固定化マイクロビーズ」

を用い、また「標識抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-86-2」をペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識した「標識抗体」を用いて、ヒトまたはマウスのCTGFを定量する方法について具体的に説明すると、例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

【0060】

また、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「13-51-2」をマイクロビーズに固定化した「抗体固定化マイクロビーズ」を用い、また「標識抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-86-2」をペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識した「標識抗体」を用いて下記と同様に操作することによって、マウスのCTGFだけでなくラット（本願において初めて開示される）のCTGFも定量することができる。

【0061】

第1の方法は、下記のような工程から構成される。

（工程1）本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロビーズに固定化し、抗体固定化マイクロビーズを作製する工程；

（工程2）試験管、マイクロプレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に緩衝液とともに該抗体固定化マイクロビーズとヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、該マイクロビーズ上に固定化されたモノクローナル抗体と試料とを反応させる工程；

（工程3）容器中の内溶液を除去し、ビーズを洗浄する工程；

（工程4）本発明のモノクローナル抗体「8-86-2」をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識抗体を作製する工程；

（工程5）工程3で洗浄されたビーズを含有する容器に該標識抗体を加え、該ビーズ上に固定化されたモノクローナル抗体と試料中に含まれるヒトまたはマウスのCTGFとが反応して形成される抗原抗体複合体に該標識抗体を反応させる工程；

【0062】

（工程6）容器中の内溶液の除去し、ビーズを洗浄することにより、未反応の標

識抗体を取り除く工程；

（工程 7）工程 6 で洗浄されたビーズを含む容器に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程 5 でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程 5 でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程；

（工程 8）工程 7 で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

（工程 9）工程 7 または工程 8 の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

（工程 10）比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0063】

第 2 の方法は、下記のような工程から構成される。

（工程 1）本発明のモノクローナル抗体「8-86-2」をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識抗体を作製する工程；

（工程 2）試験管、マイクロプレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に緩衝液とともに該標識抗体とヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、該標識抗体と試料とを反応させる工程；

（工程 3）本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロビーズに固定化し、抗体固定化マイクロビーズを作製する工程；

（工程 4）工程 2 の反応系に、該ビーズを加え、標識抗体と試料中に含まれるヒトまたはマウスの CTGF とが反応して形成される抗原抗体複合体と、該ビーズ上に固定化されたモノクローナル抗体とを反応させる工程；

（工程 5）容器中の内溶液の除去し、ビーズを洗浄することにより、未反応の標識抗体を取り除く工程；

【0064】

（工程 6）工程 5 で洗浄されたビーズを含む容器に、必要に応じて発色物質と共

に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程2でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程2でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程；

（工程7）工程6で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

（工程8）工程6または工程7の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

（工程9）比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0065】

第3の方法は、下記のような工程から構成される。

（工程1）本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロビーズに固定化し、抗体固定化マイクロビーズを作製する工程；

（工程2）本発明のモノクローナル抗体「8-86-2」をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識抗体を作製する工程；

（工程3）試験管、プレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に緩衝液とともに、工程1で作製された抗体固定化マイクロビーズ、工程2で作製された標識抗体、及びヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、該ビーズ上に固定化されたモノクローナル抗体、標識抗体、及び試料を同時に反応させる工程；

（工程4）容器中の内溶液を除去し、該ビーズを洗浄することにより、未反応の標識抗体を取り除く工程；

【0066】

（工程5）工程4で洗浄されたビーズを含む容器に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程3でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程3でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる

工程；

(工程6) 工程5で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程7) 工程5または工程6の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程8) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0067】

一抗体固相法は、前述の本発明の(29)で述べた方法、即ち、少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の抗体固定化不溶性担体に、試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質を反応せしめる工程。

【0068】

本発明に即して、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロプレートに固定化した「抗体固定化マイクロプレート」を用い、また「標識物質」として、特に一般的であるペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンを用いて、ヒトまたはマウスのCTGFを定量する方法について具体的に説明すると、例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

また、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「13-51-2」をマイクロプレートに固定化した「抗体固定化マイクロプレート」を用い、また「標識物質」として、特に一般的であるペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンを用いて下記と同様に操作することによって、マウスのCTGFだけでなくラット(本願において初めて開示される)のCTGFも定量することができる。

【0069】

(工程1) 本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロプレートに固定化し、抗体固定化マイクロプレートを作製する工程；

(工程2) ヒトまたはマウスのCTGFの標準物質をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識CTGF標準物質を作製する工程；

(工程3) 該マイクロプレートにヒトまたはマウスの血清等の試料及び該標識CTGF標準物質を加え、該試料と標識標準物質とを、該マイクロプレート上に固定化されたモノクローナル抗体と競合的に反応させる工程；

(工程4) マイクロプレートを洗浄し、未反応の標識標準物質を、マイクロプレートから取り除く工程；

【0070】

(工程5) 工程4で洗浄されたマイクロプレートに、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程3でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識標準物質を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程3でビオチンで標識した標識標準物質を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識標準物質上の標識物質とを反応させる工程；

(工程6) 工程5で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程7) マイクロプレートに反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程8) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0071】

二抗体液相法は、前述の本発明の(30)及び(31)に記載した方法である。

即ち、第一は、少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質との混合物に、本発明のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；及び

(b) 該試料中に含まれる哺乳動物のCTGF若しくは該標識された哺乳動

物のCTGFの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

~~【0072】~~

第2は、少なくとも下記（a）乃至（c）の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 試料に、本発明のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；

(b) (a) の工程を行った反応系に、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質を反応せしめる工程；及び

(c) 該試料中に含まれる哺乳動物のCTGF若しくは該標識された哺乳動物のCTGFの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

【 0 0 7 3 】

本発明に即して、「モノクローナル抗体」として図 1 に記載のモノクローナル抗体「8-64-6」または「8-86-2」を用い、また「標識物質」として、特に一般的であるペルオキシダーゼ等の酵素またはビオチンを用いて、ヒトまたはマウスの CTGF を定量する方法について具体的に説明すると、例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

また、「モノクローナル抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「13-51-2」を用い、また「標識物質」としてペルオキシダーゼ等の酵素またはビオチンを用いて下記と同様に操作することによって、マウスのCTGFだけでなくラット（本願において初めて開示される）のCTGFも定量することができる。

【0074】

第1の方法は、下記のような工程から構成される。

(工程1) ヒトまたはマウスのCTGFの標準物質をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識CTGF標準物質を作製する工程；

(工程2) 試験管、プレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に

、マウスまたはヒトの血清等の試料と工程1で作製された標識CTGF標準物質との混合物を加え、次いで本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」または「8-86-2」を加え、該試料と標識CTGF標準物質とを競合的に該モノクローナル抗体と反応させる工程；

(工程3) ヤギ抗マウスγグロブリン血清等のようなマウス由来のモノクローナル抗体に反応性を有するマウス以外の動物由来の抗血清を加え、工程2において形成される試料中に含まれる哺乳動物CTGF若しくは標識CTGF標準物質と該モノクローナル抗体との抗原抗体複合体に該抗血清を反応させ、該複合体と抗血清とからなる複合凝集物を凝集沈殿させる工程；

(工程4) 工程3の反応系を遠心分離して凝集沈殿した複合体を分離する工程；

【0075】

(工程5) 工程4で分離された複合凝集物に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程2でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識標準物質を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程2でビオチンで標識した標識標準物質を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識標準物質上の標識物質とを反応させる工程；

(工程6) 工程5で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程7) 工程5乃至工程6の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程8) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0076】

第2の方法は、下記のような工程から構成される。

(工程1) ヒトまたはマウスのCTGFの標準物質をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識CTGF標準物質を作製する工程；

(工程2) 試験管、プレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器にヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、次いで本発明のモノクローナル抗体「

8-64-6」または「8-86-2」を加え、該試料と該モノクローナル抗体とを反応させる工程；

(工程3) 工程2の反応系に、工程1で作製した標識CTGF標準物質を加え、該標識CTGF標準物質と、工程2で試料と未反応であった残余のモノクローナル抗体とを反応させる工程；

(工程4) ヤギ抗マウスγグロブリン血清等のようなマウス由来のモノクローナル抗体に反応性を有するマウス以外の動物由来の抗血清を加え、工程2において形成される試料中に含まれる哺乳動物CTGFと該モノクローナル抗体との抗原抗体複合体、及び／または工程3において形成される標識CTGF標準物質と該モノクローナル抗体との抗原抗体複合体に、該抗血清を反応させ、該複合体と抗血清とからなる複合凝集物を凝集沈殿させる工程；

(工程5) 工程4の反応系を遠心分離して凝集沈殿した複合体を分離する工程；

【0077】

(工程6) 工程5で分離された複合凝集物に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程3でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識標準物質を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程3でビオチンで標識した標識標準物質を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識標準物質上の標識物質とを反応させる工程；

(工程7) 工程6で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程8) 工程6乃至工程7の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程9) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0078】

本発明における「アフィニティークロマトグラフィー」とは、抗原と抗体、酵素と基質、あるいは受容体とリガンドといった物質間の相互作用（親和性）を利用することにより試料（例えば、血清及び血漿等の体液試料、培養上清あるいは

遠心上清等) 中に含まれる目的物質を分離または精製する方法を意味する。

本発明の方法は、抗原抗体反応、即ち、抗原としての哺乳動物のCTGFと、哺乳動物のCTGFに反応性を有する本発明のモノクローナル抗体との親和性を利用することにより、試料(例えば、血清及び血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等) 中に含まれるCTGFを分離または精製する方法を意味する。

【0079】

具体的には、(1) 前述のような不溶性担体であるフィルターあるいはメンブレン等に哺乳動物のCTGFに反応性を有する本発明のモノクローナル抗体(あるいは抗体フラグメント)を固定化した後、該フィルターあるいはメンブレンに試料を接触させることにより該試料中に含まれるCTGFを分離する方法、及び(2) 前述のようなセルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のような不溶性担体上に本発明の哺乳動物のCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体(あるいは抗体フラグメント)を常法により固定化(物理的吸着、架橋による高分子化、マトリックス中への封印あるいは非共有結合等による固定化)し、該不溶性担体をガラス製、プラスチック製あるいはステンレス製等のカラムに充填し、該カラム(例えば、円柱状カラム)に、試料(例えば、血清若しくは血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等)を通じて溶出させることにより、該試料中に含まれるCTGFを分離あるいは精製する方法である。後者(2)の方法を特にアフィニティーカラムクロマトグラフィーという。

【0080】

該アフィニティーカラムクロマトグラフィーに用いられる前記不溶性担体としては、本発明のモノクローナル抗体(あるいは抗体フラグメント)を固定化でき得るものであればどのような不溶性担体でも使用できるが、例えば、市販品である、ファルマシア(Pharmacia)社製のSephacrose 2B、Sephacrose 4B、Sephacrose 6B、CNBr-activated Sepharose 4B、AH-Sepharose 4B、CH-Sepharose 4B、Activated CH-Sepharose 4B、Epoxy-activated Sepharose 6B、Activated thiol-Sepha

rose 4B、Sephadex、CM-Sephadex、ECH-Sepharose 4B、EAH-Sepharose 4B、NHS-activated SepharoseあるいはThiopropyl Sepharose 6B等、バイオラッド(Bio-Rad)社製のBio-Gel A、Cellex、Cellex AE、Cellex-CM、Cellex PAB、Bio-Gel P、Hydrazide Bio-Gel P、Aminoethyl Bio-Gel P、Bio-Gel CM、Affi-Gel 10、Affi-Gel 15、Affi-Prep 10、Affi-Gel Hz、Affi-Prep Hz、Affi-Gel 102、CM Bio-Gel A、Affi-Gel heparin、Affi-Gel 501あるいはAffi-Gel 601等、和光純薬工業社製のクロマゲルA、クロマゲルP、エンザフィックス P-HZ、エンザフィックス P-SHあるいはエンザフィックス P-AB等、セルバ(Serva)社製のAE-Cellulose、CM-CelluloseあるいはPAB Cellulose等を挙げることができる。

【0081】

本発明における「医薬組成物」は、本発明のモノクローナル抗体（あるいは抗体フラグメント）を有効成分として、薬学的に許容され得る担体、即ち、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等の一つ以上とともに医薬組成物とし、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態により経口あるいは非経口的に投与することができる。

【0082】

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に0.1 μ g抗体/ml担体～10mg抗体/ml担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において1kg体重あたり、1 μ g～100mgの割合で、好ましくは50 μ g～50mgの割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

また、本発明の該医薬組成物は、CTGFに起因する可能性を有する種々の疾患（例えば、癌、動脈硬化症、皮膚疾患（例えば、乾癬、強皮症、アトピー、ケ

ロイド)、腎疾患、関節炎(例えば、慢性関節リウマチ)、各種線維症(動脈硬化、肝硬変、関節炎、強皮症、ケロイド、腎線維化、及び肺線維症等で見られる組織線維化)等)の治療または予防への適用が可能である。

【0083】

また、本発明の医薬組成物の種々疾患症状の治療効果については、常法に従って、既知の疾患モデル動物に投与することにより試験、検討することができる。

例えば、動脈硬化症及び再狭窄への効果の検討の場合には、ラット大動脈にバルーンカテーテルを挿入しPTCAを施し疑似的に作成した再狭窄モデルを使用することができる。

例えば、腫瘍の増殖及び転移への効果の確認の場合には、Balb/cマウス等の正常マウス、ヌードマウスもしくはSCIDマウス等のモデルマウス等の市販のマウスの例えば尾静脈、脾臓内、腎被膜下、腹腔内あるいは盲腸壁内等に、癌細胞を移植することにより作製した癌転移モデルを用いることができる。

【0084】

本発明の「ラットのCTGF」(具体的には、配列番号1に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する)及び「ラットのCTGFをコードするDNA」(具体的には、配列番号2に記載される塩基配列中の塩基番号213乃至1256迄の塩基配列を含むDNA)は、下記のような意味を以て定義されるとともに、下記に述べるような常法に従って製造することができる。

【0085】

なお、「実質的に同一」なる用語は前述のと通りの意味を有する。

本発明の「ラットのCTGF」は、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

本発明の「DNA」は、本発明のラットのCTGFをコードするDNAであって、本発明のラットのCTGFをコードし得るいかなる塩基配列をも包含する。具体的には、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAが挙げられる。好適な態様としては、配列番号2に記載される塩基

配列中の塩基番号213乃至1256迄の塩基配列を含むDNA（例えば、配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA）が挙げられる。

【0086】

本発明におけるラットのCTGFをコードするDNAとしては、cDNA及びゲノミックDNAのいずれをも包含する。

本発明においては、同一のアミノ酸をコードするコドンであればどのようなコドンから構成されるDNAを含む。

また、本発明のDNAは、いかなる方法で得られるものであってもよい。例えばmRNAから調製される相補DNA（cDNA）、ゲノムDNAから調製されるDNA、化学合成によって得られるDNA、RNAまたはDNAを鋳型としてPCR法で増幅させて得られるDNAおよびこれらの方法を適当に組み合わせて構築されるDNAをも全て包含するものである。

【0087】

本発明におけるラットのCTGFをコードするDNAは、常法に従って、該ラットのCTGFをコードするmRNAからcDNAをクローン化する方法、ゲノムDNAを単離してスプライシング処理する方法、該cDNA配列若しくはmRNA配列を鋳型としてPCRにより調製する方法、または化学合成する方法等により取得することができる。

本発明のラットのCTGFをコードするDNAは、そのようにして調製した該ラットのCTGFをコードする各々のDNAを適切な制限酵素による切断（消化）し、得られたDNA断片を、必要に応じてリンカーDNAあるいはタグ（Tag）と共に、適切なDNAポリメラーゼ等を用いて連結することにより調製することができる。

【0088】

該ラットのCTGF（以下、目的蛋白という）をコードするcDNAをmRNAからクローン化する方法としては、以下の方法が例示される。

まず、目的蛋白を発現・産生する組織あるいは細胞（例えば、ラット線維芽細胞など）から目的蛋白をコードするmRNAを調製する。mRNAの調製は、例えばグアニジンチオシアネート法（チャークウィン（Chirgwin）ら、バイオケミ

ストリー (Biochemistry)、第18巻、第5294頁、1979年)、熱フェノール法もしくはAGPC法等の公知の方法を用いて調製した全RNAをオリゴ(dT)セルロースやポリU-セファロース等によるアフィニティクロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。

次いで得られたmRNAを鋳型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の方法、例えばオカヤマらの方法(モレキュラーセルバイオロジー (Mol. Cell. Biol.)、第2巻、第161頁、1982年及び同誌 第3巻、第280頁、1983年)やホフマン (Hoffman) らの方法(ジーン (Gene)、第25巻、第263頁、1983年)等によりcDNA鎖を合成し、cDNAの二本鎖cDNAへの変換を行う。このcDNAをプラスミドベクター、ファージベクターまたはコスミドベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後、大腸菌に形質移入(トランスフェクト)することによりcDNAライブラリーを作製する。

【0089】

ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであれば良い。常法的に用いられるクローニング用ベクターとしてpUC19、λgt10、λgt11等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主内で目的蛋白をコードする遺伝子を発現させるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。

プラスミドにcDNAを組み込む方法としては、例えばマニアティス (Maniatis) らの方法(モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition)、コールドスプリングハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、第1.53頁、1989年)に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、ヒュン (Hyunh) らの方法(DNAクローニング、プラクティカルアプローチ (DNA Cloning, a practical approach)、第1巻、第49頁、1985年)などが挙げられる。簡便には、市販のクローニングキット(例えば、宝酒造社製等)を用いることもできる。このようにして得られる組換えプ

ラスミドやファージベクターは、原核細胞（例えば、E. coli: HB101、DH5 α 、Y1090、DH10BまたはMC1061/P3等）等の適当な宿主に導入する。

【0090】

プラスミドを宿主に導入する方法としては、（モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition）、コールドスプリングハーバーラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）、第1.74頁、1989年）に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主に導入する方法としてはファージDNAをインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主に導入する方法等が例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット（例えば、ストラタジーン社製、アマシャム社製等）を用いることによって簡便に行うことができる。

上記の方法によって作製されたcDNAライブラリーから、目的蛋白をコードするcDNAを単離する方法は、一般的なcDNAスクリーニング法を組み合わせることによって行うことができる。

【0091】

例えば、別個に目的蛋白のアミノ酸配列に対応すると考えられるオリゴヌクレオチドを化学合成したのち、これを³²Pでラベルしてプローブとなし、公知のコロニーハイブリダイゼーション法（クランシュタイン（Crunstein）ら、プロシーディングスオブナショナルアカデミーオブサイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、第72巻、第3961頁、1975年）またはブランクハイブリダイゼーション法（Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory、第2.108頁、1989年）により、目的のcDNAを含有するクローンをスクリーニングする方法、PCRプライマーを作製し目的蛋白の特定領域をPCR法により増幅し、該領域をコードするDNA断片を有するクローンを選択する方法等が挙げられる。

【0092】

また、cDNAを発現しうるベクター（例えば、 λ gt11等のファージベクター）を用いて作製したcDNAライブラリーを用いる場合には、目的蛋白に反応性を有する抗体を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のクローンを選択することができる。大量にクローンを処理する場合には、PCR法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。

この様にして得られたDNAの塩基配列はマキサム・ギルバート法（マキサム（Maxam）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第74巻、第560頁、1977年）あるいはファージM13を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法（サンガー（Sanger）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第74巻、第5463～5467頁、1977年）によって決定することができる。目的蛋白をコードする遺伝子は、その全部または一部を上記のようにして得られるクローンから制限酵素等により切り出すことにより取得できる。

【0093】

また、前述のような目的蛋白を発現する細胞に由来するゲノムDNAから目的蛋白をコードするDNAを単離することによる調製方法としては、例えば以下の方法が例示される。

該細胞を好ましくはSDSまたはプロテナーゼK等を用いて溶解し、フェノールによる抽出を反復してDNAの脱蛋白質を行う。RNAを好ましくはリボヌクレアーゼにより消化する。得られるDNAを適当な制限酵素により部分消化し、得られるDNA断片を適当なファージまたはコスミドで増幅しライブラリーを作成する。そして目的の配列を有するクローンを、例えば放射性標識されたDNAプローブを用いる方法等により検出し、該クローンから目的蛋白をコードする遺伝子の全部または一部を制限酵素等により切り出し取得する。

【0094】

目的蛋白をコードするDNAのPCRによる調製は、該目的蛋白の既知のmRNAまたはcDNA等を鋳型として常法により調製することができる（「遺伝子増幅PCR法・基礎と新しい展開」、共立出版株式会社発行、1992年など）。

また、化学的合成による目的蛋白をコードするDNAの製造は、目的蛋白の塩基配列をもとにして、常法に従って行うことができる。

【0095】

本発明のラットのCTGFは、上述に例示した方法を用いて調製したラットのCTGFをコードするDNA（cDNAあるいはイントロンを含むゲノミックDNA）を、各々適切な制限酵素で切断することにより、該ラットのCTGFコードするDNA断片を得、それらの断片を、必要に応じてリンカーDNAあるいはタグ（Tag）と共に、適切なDNAポリメラーゼ等を用いて連結させて得たDNAを用いて、慣用される遺伝子組換え技術を用いて、常法により組換え蛋白として調製することができる。

具体的には下記の例示されるとおりである。即ち、上述のようにして調製したDNAを、下記に詳述するようなベクターに挿入して発現ベクターを作成し、該発現ベクターで後述するような宿主細胞を形質転換して形質転換体を得る。該形質転換体を培養することにより、培養上清中に該目的蛋白を産生させる。培養上清中の該目的蛋白は、カラムクロマトグラフィー等を用いて容易に精製することができる。

【0096】

本発明は、また本発明のラットCTGFをコードするDNAを含有する発現ベクターに関する。本発明の発現ベクターとしては、原核細胞及び／または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクターおよびファージベクターが包含される（Cloning Vectors: A Laboratory Manual, エルスビュー社、ニューヨーク、1985年）。

当該発現ベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター（プラスミドDNAおよびバクテリアファージDNA）に本発明のラットCTGFをコードするDNAを常法により連結することによって調製することができる。用いられる組換え用ベクターとして具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC19など、酵母由来プラスミドとして例えばpSH19、pSH15など、枯草菌由来プラスミドとして例えばpUB110、pTP5、pC194などが例示される。また、ファージとしては、λファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニヤウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス（pVL1393、インビトロゲン社製）が例示さ

れる。

【0097】

本発明のラットCTGFをコードするDNAを発現させ該ラットCTGFを生産させる目的においては、プラスミドベクターが有用である。プラスミドベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で該ラットCTGFをコードする遺伝子を発現し、これらのポリペプチドを生産する機能を有するものであれば特に制限されない。例えば、pMAL C2、pcDNA3.1(-)、pEF-BOS (ヌクレイックアシッドリサーチ (Nucleic Acid Research)、第18巻、第5322頁、1990年等)あるいはpME18S (実験医学別冊「遺伝子工学ハンドブック」、1992年等)等を挙げることができる。

【0098】

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーター-オペレーター領域、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。

宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明のラットCTGFをコードするDNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、本発明のラットCTGFをコードする遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子(マーカー)を含んでいてもよい。

【0099】

細菌中で本発明のラットCTGFを発現させるためのプロモーター-オペレーター領域は、プロモーター、オペレーターおよび Shine-Dalgarno(SD) 配列(例えば、AAGGなど)を含むものである。例えば宿主がエシェリキア属菌の場合、好適にはTrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどを含むものが例示される。

酵母中で本発明のラットCTGFを発現させるためのプロモーターとしては、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。

また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。好ましくは、SV-40、レトロウイルスである。しかし、特にこれらに限定されるものではない。また、発現にはエンハンサーの利用も効果的な方法である。

【0100】

好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン(ATG)が例示される。

終止コドンとしては、常用の終止コドン(例えば、TAG、TAA、TGA)が例示される。

ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAを言い、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド(天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント)および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coli ではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物(pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント)が、酵母では酵母2 μ プラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミドpRSVneo ATCC 37198、プラスミドpSV2dhfr ATCC 37145、プラスミドpdBPV-MMTneo ATCC 37224、プラスミドpSV2neo ATCC 37149、プラスミドpSV2bsr等があげられる。

エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えばそれぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

【0101】

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる

。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等が例示される。

遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパルラートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。

【0102】

本発明の発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他のリストラクションサイトなど）を用いることができる。

本発明の形質転換細胞は、上述の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。

【0103】

本発明で用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された組換細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞または昆虫細胞など）が例示される。

好ましくは大腸菌あるいは動物細胞であり、具体的には大腸菌（DH5 α 、DH10B、TB1、HB101、XL-2Blue等）、マウス由来細胞（COP、L、C127、Sp2/0、NS-1またはNIH3T3等）、ラット由来細胞、ハムスター由来細胞（BHKおよびCHO等）、サル由来細胞（COS1、COS3、COS7、CV1およびVelo等）およびヒト由来細胞（Hela、2倍体線維芽細胞に由来する細胞、ミエローマ細胞およびNamalwa等）などが例示される。

発現ベクターの宿主細胞への導入（形質転換（形質移入））は従来公知の方法を用いて行うことができる。

【0104】

例えば、細菌（*E. coli*、*Bacillus subtilis* 等）の場合は、例えばCohenらの方法（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*、第69巻、第2110頁、1972年）、プロトプラスト法（*Mol. Gen. Genet.*、第168巻、第111頁、1979年）やコンピテント法（*ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー*（*J. Mol. Biol.*）、第56巻、第209頁、1971年）によって、*Saccharomyces cerevisiae*の場合は、例えばハイネン（Hinnen）らの方法（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*、第75巻、第1927頁、1978年）やりチウム法（*J. Bacteriol.*、第153巻、第163頁、1983年）によって、動物細胞の場合は、例えばグラハム（Graham）の方法（*バイロロジー*（*Virology*）、第52巻、第456頁、1973年）、昆虫細胞の場合は、例えばサマーズ（Summers）らの方法（*Mol. Cell. Biol.*、第3巻、第2156～第2165頁、1983年）によってそれぞれ形質転換することができる。

【0105】

本発明のラットCTGFは、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換細胞（以下、形質移入体を包含する意味で使用する。）を栄養培地で培養することによって製造することができる。

栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素（例えば、無機塩（例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。

培養は当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温

度、培地のpHおよび培養時間は、本発明のタンパクが大量に生産されるように適宜選択される。

【0106】

なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。

宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5～8である培地である。

宿主がE. coli の場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地（ミラー（Miller）ら、Exp. Mol. Genet. Cold Spring Harbor Laboratory、第431頁、1972年）、YT培地等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14～43℃、約3～24時間行うことができる。

【0107】

宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30～40℃、約16～96時間行うことができる。

宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培（ボスチアン（Bostian）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第77巻、第4505頁、1980年）が挙げられ、pHは5～8であることが望ましい。培養は通常約20～35℃で約14～144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地（サイエンス（Science）、第122巻、第501頁、1952年）、DMEM培地（バイロロジー（Virology）、第8巻、第396頁、1959年）、RPMI 1640培地（J. Am. Med. Assoc.、第199巻、第519頁、1967年）、199培地（proc. Soc. Exp. Biol. Med.、第73巻、第1頁、1950年）、HamF12培地等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～72時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0108】

宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含むGrace's 培地（Proc. Natl.

Acad. Sci. USA、第82巻、第8404頁、1985年）等が挙げられ、そのpHは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40℃で15～100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

本発明のラットCTGFは、上述のような形質転換細胞（特に動物細胞または大腸菌）を培養することにより、培養上清中に分泌させることにより製造することができる。即ち、得られた培養物を濾過または遠心分離等の方法で培養濾液（上清）を得、該培養濾液から天然または合成蛋白質を精製並びに単離するために一般に用いられる常法に従って該本発明のラットCTGFを精製、単離する。

【0109】

単離、精製方法としては、例えばアフィニティーカラムクロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

【0110】

一方、本発明のラットCTGFが培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する場合は、培養物を濾過または遠心分離などの常法に付して菌体あるいは細胞を集め、適当な緩衝液に懸濁し、例えば超音波やリゾチーム及び凍結融解などの方法で細胞等の細胞壁および／または細胞膜を破壊した後、遠心分離やろ過などの方法で本発明のラットCTGFを含有する膜面分を得る。該膜面分をトライトン-X100等の界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を得る。そして、当該粗溶液を先に例示したような常法を用いることにより、単離、精製することができる。

【0111】

本発明における「トランスジェニックマウス」は、上述のような方法に従って調製できるヒトCTGFをコードするDNA（cDNAまたはゲノミックDNA）がマウスの内在性遺伝子座上にインテグレート（integrate）されているトラ

ンスジェニックマウスであり、該トランスジェニックマウスは、体内にヒトCTGFを発現、分泌する。

【0112】

該トランスジェニックマウスは、トランスジェニック動物の製造において通常使用されるような常法（例えば、最新動物細胞実験マニュアル、エル・アイ・シー発行、第7章、第361～第408頁、1990年を参照）に従って作製することが可能である。具体的には、例えば、正常マウス胚盤胞（blastocyst）のから取得したES細胞（embryonic stem cell）を、該ヒトCTGFをコードする遺伝子が発現可能なように挿入された発現ベクターで形質転換する。ヒトCTGFをコードする遺伝子が内在性遺伝子上にインテグレートされたES細胞を常法により選別する。次いで、選別したES細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵（胚盤胞）にマイクロインジェクションする（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, No.12, pp.7380-7384, 1980；米国特許第4,873,191号公報）。該胚盤胞を仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。そうして該仮親マウスから、キメラトランスジェニックマウスが生まれる。該キメラトランスジェニックマウスを正常マウスと交配させることによりヘテロトランスジェニックマウスを得る。該ヘテロ（heterogeneous）トランスジェニックマウス同士を交配することにより、メンデルの法則に従って、ホモ（homogeneous）トランスジェニックマウスが得られる。

【0113】

【実施例】

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

【0114】

実施例1 ヒトCTGFに対するポリクローナル抗体の調製

ヒトCTGFの第242乃至第252番目のアミノ酸配列（Cys-Glu-Ala-Asp-Leu-Glu-Glu-Asn-Ile-Lys）にあたるペプチドを、ペプチドシンセサイザー（Applied Biosystems社製）を用いて常法に従って合成した。免疫感作抗原としては、該ペプチドをフロインド完全アジュバント（Freund's complete adjuvant）

とともにエマルジョン化したものを用いた。該ペプチド (0.32mg/kg) を、ニュージーランドホワイトウサギ (NZW、Simunek, Inc. 製) の皮下に 1 日目 (0.8mg)、14 日目 (0.8mg)、35 日目 (0.8mg) 及び 49 日目 (0.8mg) という間隔及び量で投与した。該ペプチドを用いて、適宜、血清中の抗体価を測定した。次いで、常法により血清を取得し、該ペプチドをカップリングさせたアガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより該血清から、ヒト CTGF に対するポリクローナル抗体 (IgG) を精製した。ヒト CTGF に対する反応性を、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 及びウェスタンブロッティングにより確認した。

【0115】

実施例 2 組換ヒト CTGF の調製

<2-1> ヒト腎臓由来線維芽細胞株 293 での一過性発現

ヒト CTGF をコードする cDNA を PCR 法を用いて常法により調製した。具体的には、ヒト軟骨腫細胞株 HCS 2/8 から調製した cDNA を鋳型とし、ヒト CTGF の cDNA (The Journal of Cell Biology, Vol.114, No.6, p.1287-1294, 1991) を基に設計したプライマーを用いて合成した。得られた翻訳領域を含むヒト CTGF の cDNA をプラスミド p cDNA3.1(-) (Invitrogen 社製) に挿入し発現ベクターを作成し、エレクトロポレーションにより、該ベクターでヒト腎臓由来線維芽細胞株 293 (ATCC CRL1573) を形質転換した。形質転換細胞を、無血清培地 ASF104 (味の素社製) 中で 3 日間培養し、組換ヒト CTGF を一過性に発現させた。ヒト CTGF の発現を、実施例 1 で調製したポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

培養培養上清を回収し、硫化アンモニウム沈澱法に供した後、ヘパリンカラムクロマトグラフィーに供し、0.3M の NaCl/PBS で洗浄した後、0.5M の NaCl/PBS で溶出し、部分精製ヒト CTGF 画分を得た。

【0116】

<2-2> ヒト上皮様細胞株 HeLa での安定発現

実施例<2-1>と同様の方法により、ヒト CTGF をコードする cDNA を PCR 法を用いて常法により調製した。得られた翻訳領域を含むヒト CTGF の

cDNAをプラスミドp cDNA3.1(-) (Invitrogen社製) に挿入し発現ベクターを作成し、エレクトロポレーションにより、該ベクターでヒト上皮様細胞株H e l a (ATCC CCL-2) を形質転換した。形質転換細胞を、Geneticin (0.8mg/ml ; GIBCO-BRL社製) 及び10%ウシ胎児血清 (fetal calf serum) を含有するRPMI1640培地中で約2週間培養することにより、Geneticin耐性形質転換細胞クローンを選別した。選別された形質転換細胞を、無血清培地A S F 1 0 4 (味の素社製) 中培養し、組換ヒトCTGFをに発現させた。ヒトCTGFの発現を、実施例1で調製したポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

培養培養上清を回収し、硫化アンモニウム沈澱法に供した後、ヘパリンカラムクロマトグラフィーに供し、0.3MのNaCl/PBSで洗浄した後、0.5MのNaCl/PBSで溶出し、部分精製ヒトCTGF画分を得た。

【0117】

実施例3 組換マウスCTGFの調製

既報のマウスCTGFをコードするcDNA配列 (特開平5-255397号公報、Cell Growth Differ., Vol.2, No.5, p.225-233, 1991; FEBS Letters, Vol.327, No.2, p.125-130, 1993; 及びDNA Cell Biol., Vol.10, No.4, p.293-300, 1991を参照。) に基づき、実施例2と同様にして部分精製組換マウスCTGFを調製した。

【0118】

実施例4 抗ヒトCTGFモノクローナル抗体並びに抗マウスCTGFモノクローナル抗体の調製

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、実験医学 (別冊) 細胞工学ハンドブック (黒木登志夫ら編集、羊土社発行、第66～第74頁、1992年) 及び単クローン抗体実験操作入門 (安東民衛ら著作、講談社発行、1991年) 等に記載されるような一般的方法に従って調製した。

免疫原としてのヒトCTGFは、実施例2で2種類の方法を用いて調製した組換ヒトCTGFのいずれか、またはそれらの混合物を用いた。またマウスCTGFは、実施例3で調製した組換えマウスCTGFを用いた。

被免疫動物としては、①正常マウス（BALB/cマウス、雌、4～5週齢、静岡研究動物センター（製））、②正常ラット（Wistar ラット、雌、4～5週齢、静岡研究動物センター（製））、③正常ハムスター（Armenianハムスター、雄、4～5週齢、オリエンタル酵母（製））並びに④ヒト抗体産生トランスジェニックマウス（Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; 特 表平4-504365号公報; 特表平7-509137号公報; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年等に記載の方法に従って作製した。）を用いた。

特に断わりのない限り、いずれの動物を用いた場合のモノクローナル抗体の作製も同一の方法を用いた。また、細胞培養操作は、マルチウェルマイクロプレートを用いて行った。

【0119】

<4-1> 抗ヒトCTGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

前記の正常マウス及びヒト抗体産生トランスジェニックマウスの各々に、実施例2で調製した部分精製組換えヒトCTGF（ $1\mu\text{g}$ / 匹）を、完全フロインドアジュバント（Complete Freund's Adjuvant）とともにフッドパッド内注射することにより初回（0日）免疫した。初回免疫から1週間毎に同組換えヒトCTGFをフッドパッド内注射により4回以上追加免疫し、さらに以下に述べるリンパ節細胞の取得の前々日にも同様にして最終免疫した。

各々の動物から採取したリンパ節細胞とマウスミエローマ細胞とを5：1で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール4000またはポリエチレングリコール1500（GIBCO社製）を用いて細胞融合させることによりハイブリドーマを作製した。なお、正常マウスのリンパ節細胞の細胞融合は、マウスミエローマPAI（JCR No.B0113; Res. Disclosure Vol. 217, p.155, 1982）を用い、ヒト抗体産生トランスジェニックマウスのリンパ節細胞の細胞融合は、マウスミエローマP3/X63-AG8.653（ATCC No.: CRL 1580）を用いた。

ハイブリドーマの選択は、10%のウシ胎児血清（Fetal Calf Serum、FCS）とアミノプテリンを含有するHAT含有ASF104培地（味の素（製））中で培養することにより行った。

各々のハイブリドーマクローンの培養上清の、免疫原として用いた組換えヒトCTGFに対する反応性を、後述するELISAにより測定することにより各々の動物種について多数の抗体産生ハイブリドーマを得た。

【0120】

正常マウス（マウス抗ヒトCTGFモノクローナル抗体）については、8-64-6、8-86-2、8-97-3、8-149-3及び15-38-1と命名したクローンを得た（図1）。

ハイブリドーマクローン8-86-2及び8-64-6は共に、平成9年12月18日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託した（クローン8-86-2：国際寄託番号FERM BP-6208；クローン8-64-6：国際寄託番号FERM BP-6209）。

ヒト抗体産生トランスジェニックマウス（ヒト抗ヒトCTGFモノクローナル抗体）については、A4.3、A11.1、A15.1、A29.6、B13.7、B22.2、B29.6、B35.1、C2.1、C26.11、C59.1及びC114.4と命名したクローンを得た（図1）。

【0121】

<4-2> 抗マウスCTGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

前記の正常ラット及び正常ハムスターに、実施例3で調製した部分精製組換えマウスCTGF（ $2\mu\text{g}$ / 匹）を、完全フロインドアジュバント（Complete Freund's Adjuvant）とともにフッドパッド内注射することにより初回（0日）免疫した。初回免疫から一週間毎に4回以上同組換えマウスCTGFをフッドパッド内注射により追加免疫し、さらに以下に述べるリンパ節細胞の取得の前々日にも同様にして最終免疫した。

各々の免疫感作動物の膝窩リンパ節細胞を常法に従って外科手術により採取した。

各々の動物から採取したリンパ節細胞とマウスミエローマ細胞PAI（JCR No. B0113；Res. Disclosure Vol. 217, p.155, 1982）とを5：1で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール4000またはポリエチレングリコール1500（GIBC 0社製）を用いて細胞融合させることによりハイブリドーマを作製した。

ハイブリドーマの選択は、10%のウシ胎児血清（Fetal Calf Serum、FCS）とアミノプテリンを含有するHAT含有ASF104培地（味の素（製））中で培養することにより行った。

【0122】

各々のハイブリドーマクローンの培養上清の、免疫原として用いた組換えマウスCTGFに対する反応性を、後述するELISAにより測定することにより各々の動物種について多数の抗体産生ハイブリドーマを得た。

正常ラット（ラット抗マウスCTGFモノクローナル抗体）については、13-51-2、17-132、23-96、24-53、24-67、25-91、25-101、25-256、25-338、25-410及び25-463と命名したクローンを得た（図1）。

正常ハムスター（ハムスター抗マウスCTGFモノクローナル抗体）については、2-228-1と命名したクローンを得た（図1）。

【0123】

<4-3> モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのELISAによるスクリーニング

実施例<4-1>及び<4-2>で行ったELISAは、下記のとおりである。

実施例2で調製した組換えヒトCTGF（ $0.2\mu\text{g}$ /ウェル）または実施例3で調製した組換えマウスCTGF（ $0.2\mu\text{g}$ /ウェル）を、ELISA用96穴マイクロプレート（コーニング（Corning）社製）の各ウェルに加え、室温で2時間インキュベートし、組換えヒトCTGFまたは組換えマウスCTGFをマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルに、ブロッキング試薬（ $200\mu\text{l}$ 、3%BSA含有リン酸緩衝液）を加え室温で2時間インキュベートし、CTGFが結合していない部位をブロックした。各ウェルを、0.1%のTween20を含有するリン酸緩衝液 $200\mu\text{l}$ で3回洗浄した。このようにして、各ウェルを組換えヒトCTGFまたは組換えマウスCTGFでコーティングしたマイクロプレートを作製した。

各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清（ $100\mu\text{l}$ ）を加え、40分間反応させた後、各ウェルを、0.1%のTween20を含有するリン酸緩衝液 $200\mu\text{l}$ で3回洗浄した。

【0124】

次いで、正常マウス由来のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えたウェルにはビオチンで標識したヒツジ抗マウスイムノグロブリン抗体（

50 μ l、アマシャム社製)を、正常ラット由来のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えたウェルにはビオチンで標識したヒツジ抗ラットイムノグロブリン抗体 (50 μ l、アマシャム社製)を、正常ハムスター由来のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えたウェルにはビオチンで標識したヤギ抗ハムスターイムノグロブリン抗体 (50 μ l、Cedarlane社製)を、またヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えたウェルにはビオチンで標識したヤギ抗ヒトイムノグロブリン抗体 (50 μ l、アメリカンコーレックス社製)を加え、室温下で1時間インキュベートした。

【0125】

マイクロプレートを、0.1%Tween20を含有するリン酸緩衝液で洗浄後、ウシ血清アルブミン (BSA、1mg/ml)を含有する0.5MのNaClと20mMのHEPESからなる溶液 (pH7.0)で1000倍に希釈したストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ (Streptoavidin- β -galactosidase、50 μ l、Gibco BRL社製)を各ウェルに加え、室温下で30分間インキュベートした。

次いで、マイクロプレートを、0.1%Tween20を含有するリン酸緩衝液で洗浄後、1mg/mlのBSAを含有する100mMのNaCl、1mMのMgCl₂及び10mMのリン酸緩衝液からなる溶液 (pH7.0)で希釈した1%の4-メチルーウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド (4-Methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside、50 μ l、シグマ (Sigma) 社製)を各ウェルに加え、室温下で10分間インキュベートした。各ウェルに、1MのNa₂CO₃ (100 μ l)を加え、反応を止めた。波長460nm (励起: 355nm)での蛍光強度をフルオロスキャンIIマイクロプレートフルオロメーター (Fluoroscan II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製))で測定した。

【0126】

<4-4> モノクローナル抗体の大量調製

ICRヌードマウス (雌、7~8週齢、チャールズリバー社製)に、前記の各々のハイブリドーマクローン (各々10⁶~10⁷個/0.5ml/マウス)を、腹腔内注射した。10~20日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法により採取した

腹水から各々のモノクローナル抗体を大量に調製した。

【0127】

<4-5> モノクローナル抗体の精製

前記<4-4>で取得した各々のモノクローナル抗体腹水を遠心して得た遠心上清を、0.06Mの酢酸緩衝液 (pH4.0) で3倍に希釈し、1Nの塩酸を加えpHを4.8に調整した。次いで、カプリル酸 (Caprylic acid、和光純薬工業製) を、腹水1mlに対して0.033mlになるように室温下で攪拌しながら少しずつ加え、攪拌しながら30分間反応させた。次いで、遠心分離 (10,000rpm、20分間) し、抗体以外の蛋白を沈殿させた。遠心上清を回収し、フィルター (ミリポア社製) で濾過し、白沈を除いた。得られた濾液を、リン酸緩衝液で透析 (2時間) した。

透析後、硫酸アンモニウム (26.2g/100ml) を攪拌しながら少しずつ加え、攪拌しながら4℃で120分間反応させた。次いで、遠心分離 (10,000rpm、20分間) して、沈殿物を回収した。回収した沈殿物に、リン酸緩衝液を加え、リン酸緩衝液で透析 (4℃、24時間) し、各々の精製モノクローナル抗体を得た。

【0128】

<4-6> アイスotypesの決定

マウスモノクローナル抗体アイソタイプ決定用キット (アマシャム社製) を用い、該キットに添付の実験操作プロトコールに従って操作を行い、前述の正常マウス由来の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体 (8-64-6、8-86-2、8-97-3、8-149-3及び15-38-1) の各々のアイソタイプを決定した。いずれもIgG1/κであることが確認された (図1)。

ヒトモノクローナル抗体アイソタイプ決定用キット (アメリカン・コーレックス社製) を用い、該キットに添付の実験操作プロトコールに従って操作を行い、前述のヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来のヒト抗ヒトCTGFモノクローナル抗体 (A4.3、A11.1、A15.1、A29.6、B13.7、B22.2、B29.6、B35.1、C2.1、C26.11、C59.1 及びC114.4) の各々のアイソタイプを決定した。いずれもIgG2/κであることが確認された (図1)。

【0129】

<4-7> アフィニティーカラムの作製

NHS活性化ハイトラップカラム (HiTrap-NHS-activated Sepharose HP、5ml、ファルマシアバイオテク社製) を用い、添付のプロトコールに従ってアフィニティーカラムを作製した。具体的には、下記のとおりである。

0.5MのNaClを含有する0.2Mの炭酸水素ナトリウム溶液 (pH8.3) 中に溶解した実施例<4-5>で調製したモノクローナル抗体8-86-2 (10mg/mlセファロース) を、NHS活性化ハイトラップカラムに注入した。20℃で45分間反応させ、モノクローナル抗体8-86-2をNHS活性化セファロースに固定化した。

モノクローナル抗体8-86-2は、ヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFのいずれにも高い反応性を有するため、この抗体を用いたアフィニティーカラムを作製することにより、ヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFのいずれも精製することが可能である。

【0130】

<4-8> アフィニティークロマトグラフィーによる哺乳動物CTGFの精製

ヒトCTGFを発現する形質転換Hela細胞 (実施例<2-2>)、マウスCTGFを発現する形質転換Hela細胞 (実施例3) 及びラットCTGFを発現する形質転換Hela細胞 (実施例<11-2>) の各々の培養上清を回収し、ヘパリンカラムクロマトグラフィーに供し、0.3MのNaCl/PBSで洗浄した後、0.7MのNaCl/PBSで溶出し、ヒト、マウス及びラットのCTGF各々の粗精製画分を得た。

各々の粗精製物を、実施例<4-7>で作製した抗CTGF抗体8-86-2を吸着させたアフィニティーカラムに加え、リン酸緩衝液で洗浄した後、0.1Mのグリシン緩衝液 (pH2.5) で溶出し、0.75MのTris緩衝液 (pH9.0) で中和した。集めた溶出物をリン酸緩衝液で透析し、高純度精製された組換えヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFを得た。

各々の精製組換えCTGFを、10乃至20%の濃度勾配のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。分離したバンドを銀染色した結果、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれについても約38kDa付近にバンドが検出された (図2)。

【0131】

<4-9> 精製CTGFの細胞増殖促進活性の確認

実施例<4-8>で精製した各種組換えCTGFが生物活性を保持しているか否かを確認するため、各々の精製CTGFの細胞増殖促進活性を調べた。

96マイクロプレートを用いて、ラット腎臓線維芽細胞NRK (2×10^3 /ウェル) を、10%ウシ胎児血清(FCS)含有DMEM培地中で3日間培養した。培養上清を取り除き、DMEM培地で1回洗浄後、DMEM培地中で1日培養した。次いで、各々の培養系に各種濃度(100、50、25、12.5、6.3及び3.1 ng/ml)の精製組換えCTGFを添加して2日間培養した後、 ^3H -Thymidine (3.7 kBq/ウェル) を添加してさらに6時間培養した。細胞を回収(ハーベスト)して、細胞内に取り込まれた ^3H -Thymidineの量を液体シンチレーションカウンター(バックマン社製)にて測定した。なお、対照として、CTGFを添加せず同様に培養した場合の ^3H -Thymidineの取込みを測定した。

結果を図3に示す。ヒト、マウス及びラットのいずれの精製組換えCTGFも、濃度依存的な細胞増殖促進活性を示し、いずれの組換えCTGFも生物学的機能を保持していることが確認された。

【0132】

<4-10> 交叉反応性の確認

前述のようにして調製した種々の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体及び抗マウスCTGFモノクローナル抗体のヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFの各々に対する反応性を、実施例<4-3>に述べたELISAと同様にして調べた。

なお、本試験では、実施例<4-7>で作製したアフィニティーカラムを用いて精製したヒト、マウス及びラットの精製組換えCTGFの各々を、100、30及び10 ng/wellの濃度でコーティングしたマイクロプレートを用いた。

結果を図4乃至図6に示す。また、図4乃至図6の結果を図1に簡略化して示した。図1においては、左から順に、コーティング濃度が、100、30及び10 ng/wellでの結果を示す。各濃度における反応性は、蛍光強度が1000以上の場合は「○」を、500以上1000未満の場合は「△」を、また500未満の場合は「×」を付した。

【0133】

<4-11> CTGFと線維芽細胞との結合の阻害活性の確認

最近の研究によりCTGFが細胞接着に関与することが明らかになっている (Exp. Cell. Res., Vol.233, p.63-77, 1997)。そこで、前記のようにして調製した種々のモノクローナル抗体がCTGFの機能を阻害する活性(中和活性)を有するか否かを、CTGFが媒介する細胞接着作用に対する阻害効果を調べることにより確認した。

実施例<4-3>と同様にして作製した組換えヒトCTGF固定化マイクロプレート(コーティング濃度: $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$)の各ウェルに、前記のようにして調製したヒトCTGFに反応性を有する各種のモノクローナル抗体($0.5 \mu\text{g}/\text{well}$)を加えた。また、実施例<4-3>と同様にして作製した組換えマウスCTGF固定化マイクロプレート(コーティング濃度: $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$)の各ウェルに、前記のようにして調製したマウスCTGFに反応性を有する各種のモノクローナル抗体($0.5 \mu\text{g}/\text{well}$)を加えた。

【0134】

各プレートの上清を除いた後、各ウェルにBCECF (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein tetraacetoxymethyl ester、モレキュラープローブ社)で標識したヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL1573) (5×10^4 /ウェル)を加え、 4°C で1時間静置した。浮遊細胞を除去し、1%NP-40含有リン酸緩衝液($100 \mu\text{l}$)を加えて、プレートに接着している細胞を可溶化した。細胞溶解により培養上清中に放出されるBCECFの蛍光強度をフルオロスキャンIIマイクロプレートフルオロメーター (Fluoroscanner II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製))を用いて測定した。

結果を図7に示す。また、図7の結果を図1に簡略化して示した。図1においては、有意差をもって細胞の接着を阻害する活性を示した場合には「○」を、該活性を有しない場合は「×」を付した。

【0135】

<4-12> ウサギ組織への交叉反応性の確認

高脂血症モデルウサギWHHL (オリエンタル酵母社製)の動脈硬化巣を外科的手

術により採取し、常法により動脈硬化症部位の動脈の凍結切片を調製した。

各切片を、下記に述べるようにベクタステインエリート (Vectastain Elite) ABCキット (フナコシ株式会社製) を用いて染色した。

該切片をアセトンで1～2分間固定し、乾燥後、希釈血清 (P B S (10ml) / 血清 (150 μ l)) で30分間湿潤させた。各切片をP B Sで洗浄後、1次抗体として前述のようにして調製した正常マウス由来の抗ヒトC T G Fモノクローナル抗体 (クローン: 8-86-2及び8-149-3)、正常ラット由来の抗マウスC T G Fモノクローナル抗体 (クローン: 13-51-2) またはヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来の抗ヒトC T G Fモノクローナル抗体 (クローン: A4.3、A11.1、A29.6、B29.6、B35.1、C26.11及びC114.4) (各々10 μ g / mlあるいはハイブリドーマ培養上清) を加え、40分間静置した。

【0136】

次いで、P B Sで洗浄し、ビオチン化2次抗体溶液 (100 μ l) を加え、30分間静置した。なお、一次抗体として正常マウス由来の抗ヒトC T G Fモノクローナル抗体を用いた場合は、ビオチン標識ウマ抗マウスイムノグロブリン抗体を、一次抗体として正常ラット由来の抗マウスC T G Fモノクローナル抗体を用いた場合は、ビオチン標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン抗体を、また一次抗体としてヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来の抗ヒトC T G Fモノクローナル抗体を用いた場合にはビオチン標識ヤギ抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いた。

各切片を、メタノール中に溶解した3%過酸化水素溶液中で10分間静置し、P B Sで洗浄した後、100 μ lのアビジン-ペルオキシダーゼ溶液 (P B S (5ml) / ペルオキシダーゼ標識アビジンD H (100 μ l) / ビオチン化過酸化水素H (100 μ l)) を加え30分間静置した。

【0137】

P B Sで洗浄後、D A B溶液 (水 (5ml) / 緩衝溶液 (100 μ l) / D A B (ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド) 溶液 (200 μ l) / 過酸化水素溶液 (100 μ l)) を加え、2～10分間静置した。

冷水で5分間洗浄した後、ギムザ (Giemsa) 染色法に供し封入処理を行った。

なお、1次抗体として、CTGFに対する反応性を有さず、且つアイソタイプの一致したモノクローナル抗体を用いて前記と同様に染色したものを対照とした。染色、封入された各組織切片を100及び200倍の倍率にて顕鏡し、結果を図8に示した。また、図8の結果を図1に簡略化して示した。図1においては、組織切片が染色された場合は「○」を、組織切片が染色されなかった場合は「×」を付した。

ヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来の抗ヒトCTGFヒトモノクローナル抗体であるクローンA4.3、A11.1、A29.6、C26.11及びC114.4、並びに正常ラット由来の抗マウスCTGFモノクローナル抗体であるクローン13-51-2は、ウサギの動脈硬化巣組織に反応性を示した。

【0138】

実施例5 ヒトCTGF及びマウスCTGFの定量のためのサンドイッチELISA系確立

<5-1> 抗体固定化マイクロプレートの作製

本実施例においてマイクロプレートに固定化するモノクローナル抗体は、前述のようにして調製した正常マウス由来のモノクローナル抗体8-64-6（国際寄託番号FERM BP-6209で識別されるハイブリドーマに由来する）を用いた。このモノクローナル抗体は、ヒトCTGFに高い反応性を有するとともに、マウスCTGFにも交叉反応性を示す。

モノクローナル抗体8-64-6をリン酸緩衝液で希釈し、 $1\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ /ウェルの濃度で、ELISA用96穴マイクロプレート（コーニング（Corning）社製）の各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートし、モノクローナル抗体8-64-6をマイクロプレートに吸着させた。

次いで、プレートをリン酸緩衝液で洗浄した後、各ウェルに3%のウシ血清アルブミン（BSA; Bovine serum albumin）を含有するリン酸緩衝液（ $200\mu\text{l}$ /ウェル）を加え、室温で2時間インキュベーションすることにより抗体が結合していない部位をブロックした。次いで、プレートをリン酸緩衝液で3回洗浄した。

【0139】

<5-2> 標識モノクローナル抗体の作製

本実施例において標識されるモノクローナル抗体は、前述のようにして調製した正常マウス由来のモノクローナル抗体8-86-2（国際寄託番号FERM BP-6208で識別されるハイブリドーマに由来する）を用いた。このモノクローナル抗体は、ヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFのいずれにも高い反応性を有する。

モノクローナル抗体8-86-2 (20mg/mlを1ml) を、0.1MのNaHCO₃ (pH8.2~8.3) 溶液で、透析（4℃、24時間）した。次いで、NHS-ビオチン（2mg/mlを100μl、ピアス社製）を加え、激しく攪拌した後、室温下で30分インキュベートした。次いで、リン酸緩衝液で透析（4℃、24時間）した。

【0140】

<5-3> サンドイッチELISAによる定量法の確立

本発明で確立されたヒトCTGF及びマウスCTGFの定量のためのサンドイッチELISA系は以下の通りである。

実施例<5-1>で作製した抗体固定化マイクロプレートの各ウェルに、測定試料（50μl/ウェル）を加え、室温で1時間インキュベートした。マイクロプレートを、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、各ウェルに、1% BSA、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で希釈した実施例<5-2>で作製したビオチン標識モノクローナル抗体（0.3μl/50μl/ウェル）を加え、室温下で1時間インキュベートした。

マイクロプレートを、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、0.5MのNaClと20mMのHEPESからなる溶液（BSA（1mg/ml）を含有、pH7.0）で1000倍に希釈したストレプトアビジン-β-ガラクトシダーゼ（Streptoavidin-β-galactosidase、50μl、ギブコ（Gibco BRL）社製）を各ウェルに加え、室温下で30分間インキュベートした。

【0141】

マイクロプレートを、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、10mMのNaCl、1mMのMgCl₂及び10mMのリン酸緩衝液（Na及びKを含有）からなる溶液（BSA（1mg/ml））を含有、pH7.0）で希釈した1%の4-メチルーウンベリフェリル-β-D-ガラクトシド（4-Methyl-umbelliferyl-β-D-galactoside、50

μ l、シグマ (Sigma) 社製) を各ウェルに加え、室温下で10分間インキュベートした。

各ウェルに、1Mの Na_2CO_3 (100 μ l) を加え、反応を止めた。波長460nm (励起: 355nm) での蛍光強度をフルオロスキャンIIマイクロプレートフルオロメーター (Fluoroscanner II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製)) で測定した。測定試料中のヒトCTGFまたはマウスCTGF量は、下記実施例で作成した検量線から求めた。

【0142】

<5-4> 検量線の作成

実施例<4-8>で調製したアフィニティー精製した組換えヒトCTGFまたは組換えマウスCTGFをCTGF標準物質 (スタンダード) として用い、実施例<5-3>で確立したサンドイッチELISAを用いて検量線を作成した。結果を図9に示す。

ヒトCTGFについては、極めて低濃度である3ng/ml~1000ng/mlの濃度範囲で有意差を持った検量線が得られた。マウスCTGFについては、30ng/ml~1000ng/mlの濃度範囲で有意差を持った検量線が得られた。しかしながら、実施例<5-3>で確立したサンドイッチELISA系では、ラットCTGFは定量できなかった。

【0143】

実施例6 マウスCTGF及びラットCTGFの定量のためのサンドイッチELISA系確立

<6-1> 抗体固定化マイクロプレートの作製

本実施例においてマイクロプレートに固定化するモノクローナル抗体は、前述のようにして調製した正常ラット由来のモノクローナル抗体13-51-2を用いた。このモノクローナル抗体は、マウスCTGFに高い反応性を有するとともに、ラットCTGFにも交叉反応性を示す。

モノクローナル抗体13-51-2をリン酸緩衝液 (PBS) で希釈し、1 μ g/50 μ l/ウェルの濃度で、ELISA用96穴マイクロプレート (コーニング (Corning) 社製) の各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートし、モノクローナル抗

体13-51-2をマイクロプレートに吸着させた。

次いで、プレートをリン酸緩衝液で洗浄した後、各ウェルに3%のウシ血清アルブミン (BSA; Bovine serum albumin) を含有するリン酸緩衝液 (200 μ l/ウェル) を加え、室温で2時間インキュベーションすることにより抗体が結合していない部位をブロックした。次いで、プレートをリン酸緩衝液で3回洗浄した。

【0144】

<6-2> 標識モノクローナル抗体の作製

実施例<5-2>で作製したビオチン標識モノクローナル抗体、即ち、ヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFのいずれにも高い反応性を有するモノクローナル抗体8-86-2 (国際寄託番号FERM BP-6208で識別されるハイブリドーマに由来する) をビオチンで標識した標識モノクローナル抗体を用いた。

【0145】

<6-3> サンドイッチELISAによる定量法の確立

本発明で確立されたマウスCTGF及びラットCTGFの定量のためのサンドイッチELISA系は以下の通りである。

実施例<6-1>で作製した抗体固定化マイクロプレートの各ウェルに、測定試料 (50 μ l/ウェル) を加え、室温で1時間インキュベートした。マイクロプレートを、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、各ウェルに、1% BSA、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で希釈した実施例<6-2>で作製したビオチン標識モノクローナル抗体 (0.3 μ l/50 μ l/ウェル) を加え、室温下で1時間インキュベートした。

マイクロプレートを、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、0.5MのNaClと20mMのHEPESからなる溶液 (BSA (1 mg/ml) を含有、pH7.0) で1000倍に希釈したストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ (Streptoavidin- β -galactosidase、50 μ l、ギブコ (Gibco BRL) 社製) を各ウェルに加え、室温下で30分間インキュベートした。

【0146】

マイクロプレートを、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、10 mMのNaCl、1mMのMgCl₂及び10mMのリン酸緩衝液 (Na及びKを含有) からなる溶液

(BSA(1mg/ml))を含有、pH7.0)で希釈した1%の4-メチルーウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド (4-Methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside、50 μ l、シグマ (Sigma) 社製) を各ウェルに加え、室温下で10分間インキュベートした。

各ウェルに、1Mの Na_2CO_3 (100 μ l) を加え、反応を止めた。波長460nm (励起: 355nm) での蛍光強度をフルオロスキャンIIマイクロプレートフルオロメーター (Fluoroscan II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製)) で測定した。測定試料中のマウスCTGFまたはラットCTGF量は、下記実施例で作成した検量線から求めた。

【0147】

<6-4> 検量線の作成

実施例<4-8>で調製したアフィニティー精製した組換えマウスCTGFまたは組換えラットCTGFをCTGF標準物質 (スタンダード) として用い、実施例<6-3>で確立したサンドイッチELISAを用いて検量線を作成した。結果を図10に示す。

マウスCTGFについては、極めて低濃度である1ng/ml~1000ng/mlの濃度範囲で有意差を持った検量線が得られた。ラットCTGFについては、10ng/ml~1000ng/mlの濃度範囲で有意差を持った検量線が得られた。しかしながら、実施例<6-3>で確立したサンドイッチELISA系では、ヒトCTGFは定量できなかった。

【0148】

実施例7 各種疾患に罹患している患者の血清中のCTGFの定量

実施例<5-3>で確立されたサンドイッチELISAによる定量法を用いて各種患者の血清中のCTGFを定量した。

本試験で用いたヒト血清は、健常人 (33検体)、胆道閉鎖症に罹患し、外科手術を受けた患者の術後サンプル (<第1群>臨床所見は正常な患者 (17検体)、<第2群>症状進行中の患者 (14検体)、及び<第3群>肝臓移植を必要とする重症患者 (8検体))、リウマチ性血管炎に罹患している患者 (10検体)、悪性リウマチ性関節炎に罹患している患者 (17検体)、乾癬に罹患に罹患

している患者（24検体）、及びアトピー性皮膚炎に罹患している患者（34検体）の各々から採取した血清である。

結果を図11（胆道閉鎖症）及び図12（リウマチ性血管炎、悪性リウマチ性関節炎、乾癬及びアトピー性皮膚炎）に示す。

胆道閉鎖症患者では、CTGFが第2群（症状進行期）で有意な発現することが明らかとなった。また、リウマチ性血管炎、悪性リウマチ性関節炎では、健常人に比べ有意に多くのCTGFを発現していることが明らかとなった。

この結果から、本発明のアッセイ系は、健常人のみならず種々の疾患患者でのCTGFの発現状態を高感度で定量することができ、その病状の進行程度を的確に把握するための臨床診断薬としての有用性を有していると言えることができる。

【0149】

実施例8 抗体フラグメントF(ab')₂及びFabの調製

前述のようにして調製した各種モノクローナル抗体の抗体フラグメントF(ab')₂及びFabは、下記のようにして調製する。

モノクローナル抗体（5mg/ml）を、20mMの酢酸ナトリウム緩衝液（pH3.5）に加え、37℃で30分間インキュベートする。次いで、不溶化ペプシン（1ml、ピアス社製）を加え、ローテーターで回転させながら37℃で12時間インキュベートする。反応液を回収し、遠心分離（3000rpm、10分間）し、上清を回収する。

プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを、プロテインAカラムキット（アマシャム社製）のプロトコールに従って以下のようにして行う。遠心沈殿物に結合緩衝液を加え、遠心分離（3000rpm、10分間）し、上清を回収する。2回の遠心分離で回収した上清を集め、等量の結合緩衝液を加え、さらに1Nの水酸化ナトリウムを加えてpH8.9に調整する。該混合溶液を、該結合緩衝液で平衡化した該プロテインAカラムに添加した後、該結合緩衝液（5ml）で2回洗浄し、溶出分画を回収する。得られた溶出分画を、5mMのリン酸緩衝液（2L、pH6.8）で透析（4℃、24時間）する。

【0150】

さらなる精製のためヒドロキシアパタイトカラム（バイオラッド社製）を用い

て、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を行う。透析により得られる溶液を、該ヒドロキシアパタイトカラムに添加し、5 mMのリン酸緩衝液を15分間流した後、5 mM～0.4 Mのリン酸緩衝液で直線濃度勾配溶出させる。溶出液をフラクションコレクターで分取し、280 nmでの吸光度を測定し、 $F(ab')_2$ を含む分画を回収する。得られた分画をリン酸緩衝液（2 L）で透析（4℃、24時間）し、モノクローナル抗体の精製 $F(ab')_2$ を得る。

【0151】

実施例9 ヒトCTGF発現トランスジェニックマウスの作製

実施例2で取得したヒトCTGFをコードするcDNAを、ニワトリ β アクチンプロモーターを有する発現ベクターpCAGGS（Gene, Vol.108, p.193-200, 1991）に、DNA末端平滑化キット（タカラ社製）を用いて挿入し、プラスミドp

トランスジェニックマウス作製のために、phCTGFを制限酵素処理して直鎖状にした。

【0152】

仮親マウスには、白色ICRマウス（雌、日本エスエルシー社製）と精管結紮した白色ICRマウス（雄、日本エスエルシー社製）とを交配して得られたプラグ（または腔栓）を有する雌ICRマウスを用いた。また、ヒトCTGF遺伝子を導入するための受精卵を得るための採卵用マウスは、PEAMEX（5ユニット、三共ソーキ社製）及びプレグニール（5ユニット、オルガノン社製）を投与することにより過剰排卵させたBDF-1マウス（雌、日本エスエルシー社製）をBDF-1マウス（雄、日本エスエルシー社製）と交配させて作製した。交配後、BDF-1マウス（雌）から卵管部を摘出し、ヒアルロニダーゼ処理により受精卵のみを得、培地中で保存した。

【0153】

受精卵へのヒトCTGF遺伝子の導入は、顕微鏡下でマニピュレーターを用い

て常法により行った。受精卵を保定針で固定し、37℃条件下、トリスEDTA緩衝液で希釈したヒトCTGFの前記直鎖状遺伝子を含む溶液を、DNA導入針を用いて受精卵の雄性前核内に注入した。

遺伝子導入後、正常な状態を保持する受精卵のみを選別し、仮親マウス（白色ICRマウス）の卵巣内にある卵管采に、ヒトCTGF遺伝子導入受精卵を挿入した。

仮親から生まれた子マウス（キメラマウス）の尾を切取りゲノム遺伝子を回収し、PCRによりマウスゲノム内にヒトCTGF遺伝子が導入されていることを確認した。また、実施例5で確立したサンドイッチELISAにより、該マウスの血清中にヒトCTGFが発現、分泌されていることを確認した。次いで、このキメラマウスを正常マウスと交配させることによりヒトCTGF高発現ヘテロトランスジェニックマウスを作製した。該ヘテロマウス同士を掛け合わせるによりホモマウスを作製する。

【0154】

実施例11 ラットCTGFの調製

<11-1> cDNAのクローニング

(1) ラットcDNAライブラリー及びプローブの作製

ラット腎臓由来線維芽細胞株NRK-49F (ATCC CRL-1570、約 1×10^6 /ml) を遠心 (2,000×g、5分間、4℃) して、沈殿した細胞をISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いて懸濁させた後、クロロホルムで振とう抽出して上清を回収した。得られた上清にイソプロパノールを添加して室温で10分間放置した後、遠心 (12,000×g、10分間、4℃) し、RNAを沈殿させた。沈殿したRNAをエタノールで洗浄した後、TE緩衝液に溶解した。得られた全RNAから、mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) を用いてpoly (A)⁺RNAを精製した。

【0155】

poly (A)⁺RNA (5 μg) を鋳型とし、Superscript 1 system for cDNA Synthesis Kit (GIBCO-BRL社製) を用いてcDNAを合成した。スクリーニングの効率を上げるため、NotI切断部位を有するoligo dT プライマー (GIBCO-BRL社製) を用いた。SalIアダプター付加した後NotI消化を行い、単一方向性を有するcDNAを得

た。さらにcDNAサイズ分画カラム (cDNA size fractionation column、GIBCO-BRL社製) を用いてサイズ分画を行った。

実施例2で取得したヒト及びマウスCTGFをコードするcDNA塩基配列を比較しヒト・マウス間で相同性の高い領域を利用して5'プライマー (配列番号3) 及び3'プライマー (配列番号4) を設計し、合成した。

【0156】

上記のようにして作製したcDNAライブラリーを鋳型とし、前記両プライマー及びEx Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) を用いてPCR (Polymerase Chain Reaction) を行った。反応は、DNAサーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus社製) を用いて、プライマー終濃度が $0.4\mu\text{M}$ 及び Mg^{2+} 濃度が 1.5mM の条件下で、 94°C で1分、 55°C で1分及び 72°C で1分の反応を1サイクルとして合計35サイクル行った。増幅されたDNAを、アガロースゲル電気泳動した後、QUIAEX DNA抽出キット (QUIAEX DNA Extraction Kit、QUIAGEN社製) を用いて精製した。

【0157】

回収したDNA断片をTAクローニングキット (Invitrogen社製) を用いてベクター-pCRII (Invitrogen社製) に連結した後、オートリードシーケンシングキット (Auto Read Sequencing Kit、Pharmacia社製) 及びA.L.F.DNAシーケンサー (Pharmacia社製) を用いてジデオキシ法により塩基配列を決定した。得られたcDNA断片の塩基配列を、実施例2及び実施例3で各々取得したヒト及びマウスのCTGFの塩基配列と比較した結果、当該cDNA断片はヒト及びマウスのCTGFのラットホモログ (ラットCTGF) をコードする領域を含んでいることが確認された。

該cDNA断片 (約 0.8 kb) を、ECLランダムプライムラベリングキット (ECL random prime labelling system、Amersham社製) を用いてFITC標識し、ブラークハイブリダイゼーション用プローブとして使用した。

【0158】

(2) cDNAライブラリーのベクターへの組み込み及びパッケージング

前記(1)で得られたcDNA断片を、ベクター-lZipLox NotI-SalI arm (GIBCO-BRL社製) に連結した。連結反応にはDNAライゲーションキット (DNA ligatio

n Kit、宝酒造社製）を用いた。次いで、GIGA PACK II GOLD (Stratagene社製) を用いてインビトロパッケージングした後、得られたファージ粒子を用いて、大腸菌Y1090 (GIBCO-BRL社製) を宿主として、組み換えファージを含有するプラークからなるcDNAライブラリーを作製した。

【0159】

(3) cDNAライブラリーのスクリーニング

ラピッドハイブリダイゼーション緩衝液 (Rapid hybridization buffer、Amersham社製) を用いたプラークハイブリダイゼーション法 (マニアティス (Maniatis) ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) に従い、前記(2)で調製したcDNAライブラリーのスクリーニングを下記のようにして行った。

前記(2)で得られたライブラリー (1×10^4 個プラーク) を寒天プレートに蒔き、ハイボンド-N ナイロンメンブラン (Hybond-N nylon membrane、Amersham社製) を用いてレプリカを作製した。このレプリカと前記(1)で作製したFITC標識プローブを用いて、ラピッドハイブリダイゼーション緩衝液 (Rapid hybridization buffer、Amersham社製) 中でプラークハイブリダイゼーションを行った。1次スクリーニング及び2次スクリーニングを行い、13個のポジティブ・クローンを得た。各クローンをシングルプラークで単離した後、GIBCO-BRL社のマニュアルに従ってインビボエクサイジョン (in vivo Excision) に供し、13クローンをプラスミドDNAとして回収した。

【0160】

(4) 塩基配列決定

13個のクローンについてオートリードシーケンシングキット (Auto Read Sequencing Kit、Pharmacia社製) とA.L.F.DNAシーケンサー (Pharmacia社製) を用いてジデオキシ法により塩基配列を決定した。13個のクローンはすべて同じ塩基配列を含んでいた。ヒト及びマウスCTGFのcDNA配列と比較した結果、得られたクローンr311にはラットCTGFの全長をコードするcDNA領域が含まれることが確認された。なお、得られらラットCTGFの全長cDNA配列 (5' 及び3' 末端塩基配列を含む) を配列番号2に、またその配列から演

釋されるアミノ酸配列を配列番号1に示す。

【0161】

<11-2> 組換えラットCTGFの調製

実施例<11-1>で取得したラットCTGFをコードするcDNAを含むクローンr311をSalI-DraIで消化して、ラットCTGFをコードするcDNAを含むDNA断片を切りだした。該DNA断片をプラスミドpcDNA3.1(-) (Invitrogen社製)に挿入し発現ベクターを作成した。エレクトロポレーションにより、該ベクターでヒト上皮様細胞株He1a (ATCC CCL-2)を形質転換した。形質転換細胞を、Geneticin (0.8mg/ml; GIBCO-BRL社製)及び10%ウシ胎児血清 (fetal calf serum)を含有するRPMI1640培地中で約2週間培養することにより、Geneticin耐性形質転換細胞クローンを選別した。選別された形質転換細胞を、無血清培地ASF104 (味の素社製)中培養し、組換えラットCTGFを発現させた。ラットCTGFの発現を、前記実施例4で調製したラットCTGFに交叉反応性を有するモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

培養培養上清を回収し、硫化アンモニウム沈澱法に供した後、ヘパリンカラムクロマトグラフィーに供し、0.3MのNaCl/PBSで洗浄した後、0.5MのNaCl/PBSで溶出し、部分精製ラットCTGF画分を得た。

【0162】

【発明の効果】

本発明は、未だ提供されていない、ヒト、マウス、ラット及びウサギ等の種々の哺乳動物のCTGFに対して、抗原特異性、抗原親和性、中和活性、及び交叉反応性等の性質の点で、異なる特性を有する種々の哺乳動物由来の種々のモノクローナル抗体を提供するものである。特に、遺伝子組換え技術を用いてヒトの抗体を産生するように作製したトランスジェニックマウスを免疫動物として用いることにより、ヒトCTGFに対する種々のヒトモノクローナル抗体を世界に先んじて初めて提供するものである。

【0163】

本発明のモノクローナル抗体の内、ヒトCTGFに対するモノクローナル抗体

及びその医薬組成物は、その発症がCTGFに起因することが予測される可能性を有するような種々の疾患症状（例えば、動脈硬化症、皮膚疾患（例えば、強皮症、ケロイド）、腎疾患、関節炎（例えば、慢性関節リウマチ）、肝硬変、及び肺線維症等で見られる組織線維化、癌等）の発症及び／または進行を抑制、阻止するための医薬として有用である。特に、ヒトモノクローナル抗体及びその医薬組成物は、マウス由来の抗体等の非ヒト哺乳動物由来の抗体からなる抗体医薬品の治療上の大きな問題点（副作用）であったヒトに対する抗原性を全く有しないことから、医薬品としての価値を劇的に増大させるものである。

【0164】

さらに、本発明の種々のモノクローナル抗体を用いることにより、種々哺乳動物（ヒト、マウス、ラット及びウサギ等）の体液（血清等）中のCTGFを、インタクトな状態で簡便かつ高感度で定量できる種々のイムノアッセイ系（方法及びキット）を提供することができる。また、該モノクローナル抗体を不溶性担体の固定化したアフィニティーカラムを作製することにより、種々の哺乳動物のCTGFを高純度で容易に精製することが可能となる。

【0165】

また、本発明のヒトCTGFを発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物（トランスジェニックマウス等）は、ヒトCTGFの生理学的機能を解明するためのモデル動物として有用であるだけでなく、ヒトCTGFの機能を制御（阻害、抑制、活性化、刺激など）する可能性を種々の医薬（低分子化合物、抗体、アンチセンス、ヒトCTGF以外のポリペプチドなど）をスクリーニングするためのツールといして極めて有用である。即ち、そのような薬剤を該トランスジェニック非ヒト哺乳動物に投与し、該動物中でのヒトCTGFの発現の程度を、本発明のアッセイ系（サンドイッチELISAなど）を用いて定量することにより、投与された薬剤のヒトCTGFに対する効果を評価することが可能である。

【0166】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：347

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ラット (rat)

配列：

Met	Leu	Ala	Ser	Val	Ala	Gly	Pro	Val	Ser		
1				5					10		
Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Thr	Arg		
				15					20		
Pro	Ala	Thr	Gly	Gln	Asp	Cys	Ser	Ala	Gln		
				25					30		
Cys	Gln	Cys	Ala	Arg	Glu	Ala	Ala	Pro	Arg		
				35					40		
Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Leu	Asp		
				45					50		
Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	Arg	Val	Cys	Ala	Lys		
				55					60		
Gln	Leu	Gly	Glu	Leu	Cys	Thr	Glu	Arg	Asp		
				65					70		
Pro	Cys	Asp	Pro	His	Lys	Gly	Leu	Phe	Cys		
				75					80		
Asp	Phe	Gly	Ser	Pro	Ala	Asn	Arg	Lys	Ile		
				85					90		
Gly	Val	Cys	Pro	Ala	Lys	Asp	Gly	Ala	Pro		
				95					100		
Cys	Val	Phe	Gly	Gly	Ser	Val	Tyr	Arg	Ser		
				105					110		
Gly	Glu	Ser	Phe	Gln	Ser	Ser	Cys	Lys	Tyr		

115	120
Gln Cys Thr Cys Leu Asp Gly Ala Val Gly	
125	130
Cys Val Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg	
135	140
Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg	
145	150
Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys Cys Glu	
155	160
Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Arg	
165	170
Thr Val Val Gly Pro Ala Leu Ala Ala Tyr	
175	180
Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro	
185	190
Thr Met Met Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln	
195	200
Thr Thr Glu Trp Ser Ala Cys Ser Lys Thr	
205	210
Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr	
215	220
Asn Asp Asn Thr Phe Cys Arg Leu Glu Lys	
225	230
Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys	
235	240
Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys	
245	250
Gly Lys Lys Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile	
255	260

Ala Lys Pro Val Lys Phe Glu Leu Ser Gly

265 270

Cys Thr Ser Val Lys Thr Tyr Arg Ala Lys

275 280

Phe Cys Gly Val Cys Thr Asp Gly Arg Cys

285 290

Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro

295 300

Val Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Ile

305 310

Met Lys Lys Asn Met Met Phe Ile Lys Thr

315 320

Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp

325 330

Asn Asp Ile Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg

335 340

Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala

345

【0167】

配列番号：2

配列の長さ：2338

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（3'及び5'末端塩基配列を含むcDNA）

起源

生物名：ラット (rat)

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：213 .. 1256

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：polyA signal

存在位置：2297 .. 2302

特徴を決定した方法：E

配列：

CTCCAAGAAG ACTCAGCCAG ACCCACTCCA GCTCCGACCC TAGGAGACCG	50
ACCTCCTCCA GACGGCAGCA GCCCCAGCCC AGTGGACAAC CCCAGGAGCC	100
ACCACCTGGA GCGTCCGGAC ACCAACCTCC GCCCCGAGAC CGAGTCCAGG	150
CTCCGGCCGC GCCCCTCGTC GCCTCTGCAC CCCGCTGTGC GTCCTCCTGC	200
CGCGCCCCGA CC	212
ATG CTC GCC TCC GTC GCG GGT CCC GTT AGC	242
Met Leu Ala Ser Val Ala Gly Pro Val Ser	
1 5 10	
CTC GCC TTG GTG CTC CTC CTC TGC ACC CGG	272
Leu Ala Leu Val Leu Leu Leu Cys Thr Arg	
15 20	
CCT GCC ACC GGC CAG GAC TGC AGC GCG CAG	302
Pro Ala Thr Gly Gln Asp Cys Ser Ala Gln	
25 30	
TGT CAG TGC GCA CGT GAA GCG GCG CCG CGC	332
Cys Gln Cys Ala Arg Glu Ala Ala Pro Arg	
35 40	
TGC CCC GCC GGC GTG AGC CTG GTG CTG GAC	362
Cys Pro Ala Gly Val Ser Leu Val Leu Asp	
45 50	
GGC TGC GGC TGC TGC CGC GTC TGC GCC AAG	392
Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys	
55 60	
CAG CTG GGA GAA CTG TGC ACG GAG CGT GAT	422

Gln Leu Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp

65 70

CCC TGC GAC CCA CAC AAG GGT CTC TTC TGC

452

~~Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu Phe Cys~~

75 80

GAC TTC GGC TCC CCC GCC AAC CGC AAG ATT

482

Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile

85 90

GGC GTG TGC CCT GCC AAA GAT GGT GCA CCC

512

Gly Val Cys Pro Ala Lys Asp Gly Ala Pro

95 100

TGT GTC TTC GGT GGG TCC GTG TAC CGC AGC

542

Cys Val Phe Gly Gly Ser Val Tyr Arg Ser

105 110

GGC GAG TCC TTC CAA AGC AGT TGC AAA TAC

572

Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr

115 120

CAG TGC ACT TGC CTG GAT GGG GCC GTG GGC

602

Gln Cys Thr Cys Leu Asp Gly Ala Val Gly

125 130

TGT GTG CCC CTG TGC AGC ATG GAC GTG CGC

632

Cys Val Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg

135 140

CTG CCC AGC CCT GAC TGC CCC TTC CCG AGA

662

Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg

145 150

AGG GTC AAG CTG CCC GGG AAA TGC TGT GAG

692

Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys Cys Glu

155 160

GAG TGG GTG TGT GAT GAG CCC AAG GAC CGC	722
Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Arg	
165 170	
ACA GTG GTT GGC CCT GCC CTA GCT GCC TAC	752
Thr Val Val Gly Pro Ala Leu Ala Ala Tyr	
175 180	
CGA CTG GAA GAC ACA TTT GGC CCT GAC CCA	782
Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro	
185 190	
ACT ATG ATG CGA GCC AAC TGC CTG GTC CAG	812
Thr Met Met Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln	
195 200	
ACC ACA GAG TGG AGC GCC TGT TCT AAG ACC	842
Thr Thr Glu Trp Ser Ala Cys Ser Lys Thr	
205 210	
TGT GGG ATG GGC ATC TCC ACC CGG GTT ACC	872
Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr	
215 220	
AAT GAC AAT ACC TTC TGC AGG CTG GAG AAG	902
Asn Asp Asn Thr Phe Cys Arg Leu Glu Lys	
225 230	
CAG AGT CGT CTC TGC ATG GTC AGG CCC TGT	932
Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys	
235 240	
GAA GCT GAC CTA GAG GAA AAC ATT AAG AAG	962
Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys	
245 250	
GGC AAA AAG TGC ATC CGG ACG CCT AAA ATT	992
Gly Lys Lys Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile	

255 260
GCC AAG CCT GTC AAG TTT GAG CTT TCT GGC 1022
Ala Lys Pro Val Lys Phe Glu Leu Ser Gly

265 270
TGC ACC AGT GTG AAG ACC TAC CGG GCT AAG 1052
Cys Thr Ser Val Lys Thr Tyr Arg Ala Lys

275 280
TTC TGT GGG GTG TGC ACG GAC GGC CGC TGC 1082
Phe Cys Gly Val Cys Thr Asp Gly Arg Cys

285 290
TGC ACA CCG CAC AGA ACC ACC ACA CTG CCG 1112
Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro

295 300
GTG GAG TTC AAG TGC CCC GAT GGC GAG ATC 1142
Val Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Ile

305 310
ATG AAA AAG AAC ATG ATG TTC ATC AAG ACC 1172
Met Lys Lys Asn Met Met Phe Ile Lys Thr

315 320
TGT GCC TGC CAT TAC AAC TGT CCC GGG GAC 1202
Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp

325 330
AAT GAC ATC TTT GAG TCC TTG TAC TAC AGG 1232
Asn Asp Ile Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg

335 340
AAG ATG TAT GGA GAC ATG GCG TAA 1256
Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala

345
AGCCAGGGAG TAAGGGACAC GAACTCATTT AGACTATAAC TTGAACTGAG 1306

```

TTACATCTCA TTTTCTTCTG TAAAAAAAAC AAAAAGGGTT ACAGTAGCAC 1356
ATTAATTTAA ATCTGGGTTC CTAAGTCTG TGGGAGAAAA CACCCCACCG 1406
AAGTGAGAAC CGTGTGTCAT TGTCATGCAA ATAGCCTGTC AATCTCAGAC 1456
ACTGGTTTCG AGACAGTTTA GACTTGACAG TTGTTCACTA GCGCACAGTG 1506
ACAGAACGCA CACTAAGGTG AGCCTCCTGG AAGAGTGGAG ATGCCAGGAG 1556
AAAGACAGGT ACTAGCTGAG GTCATTTTAA AAGCAGCGAT ATGCCTACTT 1606
TTTGGAGTGT GACAGGGGAG GGACATTATA GCTTGCTTGC AGACAGACCT 1656
GCTCTAGCAA GAGCTGGGTG TGTGTCTCC ACTCGGTGAG GCTGAAGCCA 1706
GCTATTCTTT CAGTAAGAAC AGCAGTTTCA GCGCTGACAT TCTGATTCCA 1756
GYGACACTGG TCGGGAGTCA GAACCTTGTC TATTAGACTG GACAGCTTGT 1806
GGCAAGTGAA TTTGCCGGTA ACAAGCCAGA TTTTATGGA TCTTGTAAT 1856
ATTGTGGATA AATATATATA TTTGTACAGT TATCTARGTT AATTTAAAGA 1906
CGTTTGTGCC TATTGTTCTT GTTTAAAGTG CTTTGGGAAT TTTTAACTG 1956
ATAGCCTCAA ACTCCAAACA CCATCGATAG GACATAAAGC TTGTCTGTGA 2006
TTCAAAACAA AGGAGATACT GCAGTGAAA CTGTAACCTG AGTGACTGTC 2056
TGTCAGAACAA TATGGTACGT AGACGGTAAA GCAATGGATC AGAAGTCAGA 2106
TTTCTAGTAG GAAATGTAAA ATCACTGTTG GCGAACAAAT GGCCTTTATT 2156
AAGAAATGGC TTGCTCAGGG TAACTGGTCA GATTTCCACG AGGAAGTGTT 2206
TGCTGCTTCT TTGACTATGA CTGGTTTGGG AGGCAGTTTA TTTGTTGAGA 2256
GTGTGACCAA AAGTTACATG TTTGCACCTT TCTAGTTGAA AATAAAGTAT 2306
ATATATTTTT TATATGAAAA AAAAAAAAAA AA 2338

```

【0168】

配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴

特徴を表す記号：primer bind

存在位置：1 .. 20

特徴を決定した方法：E

配列：

TGCGGCTGCT GCCGCGTCTG

20

【0169】

配列番号：4

配列の長さ：21

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴

特徴を表す記号：primer bind

存在位置：1 .. 21

特徴を決定した方法：E

配列：

GCACAGGTCT TGATGAACAT C

21

【0170】

【図面の簡単な説明】

【図1】

ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体の特性を示す図。

【図2】

ヒト、マウス及びラットのいずれのCTGFにも反応性を有するモノクローナル抗体8-86-2を吸着させたアフィニティーカラムを用いて精製した組換えヒトCTGF、組換えマウスCTGF及び組換えラットCTGFのSDSポリアクリルアミドゲルでの電気泳動の状態を示す図。

【図3】

ヒト、マウス及びラットのいずれのCTGFにも反応性を有するモノクローナル抗体8-86-2を吸着させたアフィニティーカラムを用いて精製した組換えヒトC

TGF、組換えマウスCTGF及び組換えラットCTGFの、ラット腎臓由来線維芽細胞NRKの細胞増殖促進活性を示す図。

縦軸は細胞増殖促進活性の強弱の指標としての $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は各々の組換えCTGFの濃度を示す。

【図4】

ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体のヒトCTGFに対する反応性を示す図。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のヒトCTGFにおけるELISAで試験したモノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図5】

ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体のマウスCTGFに対する反応性を示す図。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のマウスCTGFにおけるELISAで試験したモノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図6】

ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体のラットCTGFに対する反応性を示す図。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のラットCTGFにおけるELISAで試験したモノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図7】

ヒト腎臓由来線維芽細胞株293とヒトCTGFまたはマウスCTGFとの接着に対する、ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体の阻害活性を示す図。

縦軸は阻害活性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は試験した各種モノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図8】

ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体の動脈硬化症モデルウサギWHHLの動脈硬化巣組織切片への反応性を示す該組織の染色状態を示す図。

分図（a）は対照試験での染色状態を示し、分図（b）はモノクローナル抗体B35.1での試験での染色状態を示し、分図（c）はモノクローナル抗体B29.6での試験での染色状態を示し、分図（d）はモノクローナル抗体13-51-2での試験での染色状態を示し、分図（e）はモノクローナル抗体A4.3での試験での染色状態を示し、分図（f）はモノクローナル抗体C114.4での試験での染色状態を示し、分図（g）はモノクローナル抗体A11.1での試験での染色状態を示し、分図（h）はモノクローナル抗体A29.6での試験での染色状態を示し、また分図（i）はモノクローナル抗体C26.11での試験での染色状態を示す。

【図9】

モノクローナル抗体8-64-6及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した標準ヒトCTGF、標準マウスCTGF及び標準ラットCTGFの検量線を示す図。

縦軸は蛍光強度を示し、横軸は標準CTGFの濃度を示す。

【図10】

モノクローナル抗体13-51-2及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した標準ヒトCTGF、標準マウスCTGF及び標準ラットCTGFの検量線を示す図。

縦軸は蛍光強度を示し、横軸は標準CTGFの濃度を示す。

【図11】

モノクローナル抗体8-64-6及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した胆道閉鎖症患者的の各種血清検体中に含まれるCTGF濃度を示す図。

縦軸は定量値（CTGF含量）を示し、横軸は試験した検体群の種類を示す。なお、第1群（I）は臨床所見は正常な患者の検体であり、第2群（II）は症状進行中の患者の検体であり、また第3群（III）は肝臓移植を必要とする重症患者の検体である。

【図12】

モノクローナル抗体8-64-6及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した各種患者の血清検体中に含まれるCTGF濃度を示す図。

縦軸は定量値（CTGF含量）を示し、横軸は試験した検体を採取した患者が

特平 9-367699

罹患している疾患名を示す。

【書類名】

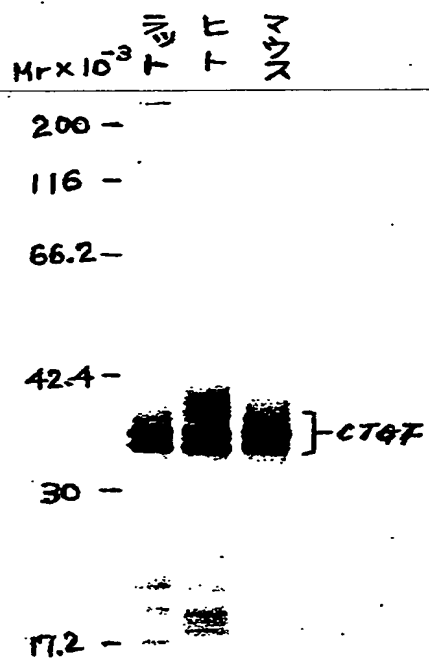
図面

【図1】

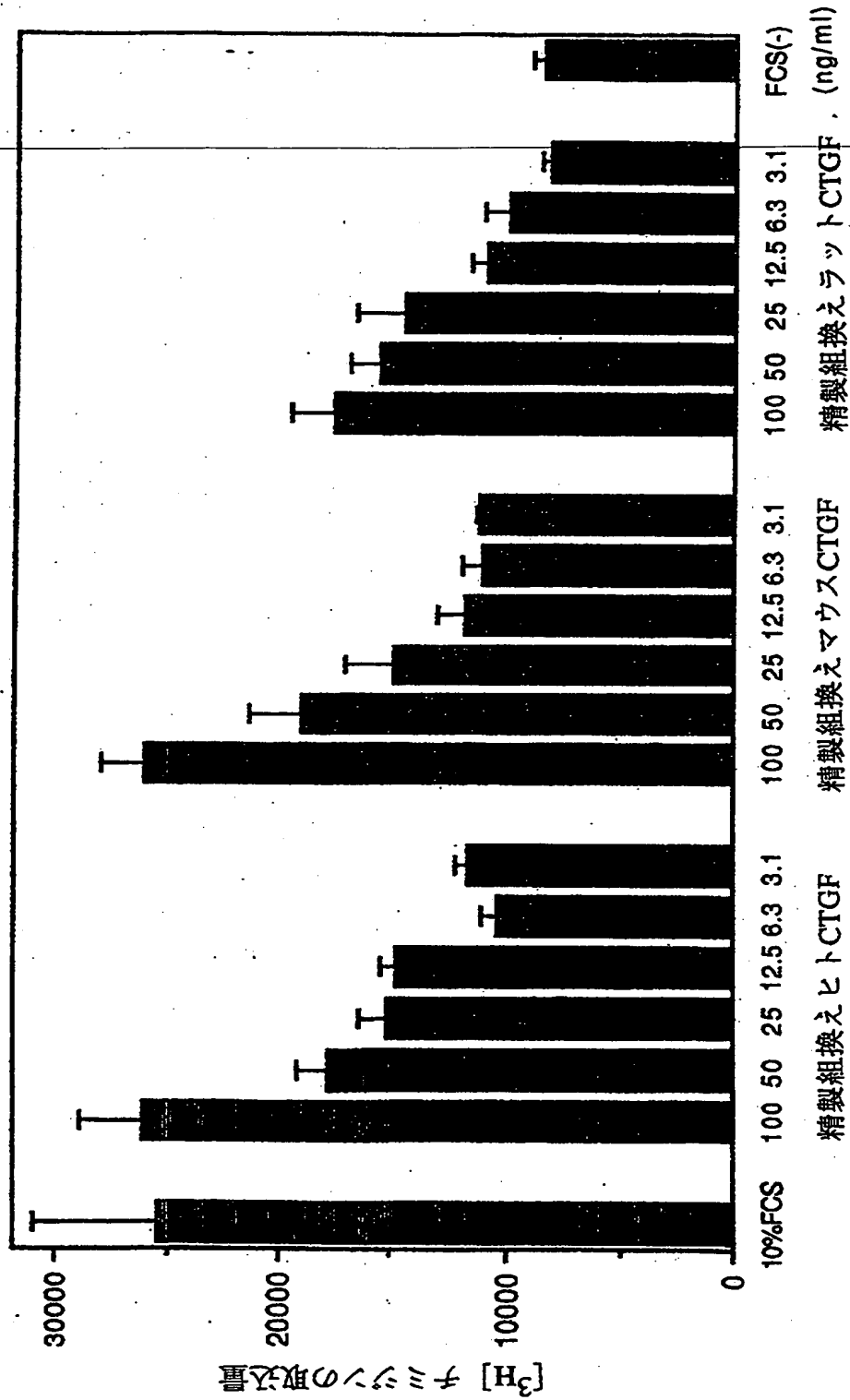
クローン名	免疫動物	抗原	アインタイプ	交叉反応性			H2L ウサギの 動脈硬化組織 への反応性	293細胞の 結合阻害活性
				ヒト	マウス	ラット		
A4.3	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2a・K	OOO	OOO	OOO	O	O
A11.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2a・K	OOO	OOA	OXX	O	O
A15.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2a・K	OOO	OXX	XXX		O
A29.6	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2a・K	OOO	OXX	XXX	O	O
B13.7	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2a・K	OOO	OXX	ΔXX		X
B22.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2a・K	OOO	OOO	OOO		X
B29.6	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2a・K	OOO	OOO	OOO	X	X
B35.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2a・K	OOO	OOO	OOO	X	O
C2.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2a・K	OXX	OXX	ΔXX		X
C26.11	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2a・K	OOO	OOO	OOA	O	O
C39.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2a・K	OOO	OOO	OOO		X
C114.4	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2a・K	OOO	OXX	OXX	O	O
B-84-6	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OXX	OXX		O
B-86-2	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OOO	OOO	X	O
B-97-3	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOA	OOA	OOA		X
B-149-3	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OXX	OXX	X	O
15-39-1	正常マウス	ヒト CTGF		OOA	OOA	OOA		
13-51-2	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OOO	O	X
17-132	正常ラット	マウス CTGF		OOA	OOA	OXX		O
23-96	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OXX		X
24-53	正常ラット	マウス CTGF		OOO	OOO	OOA		X
24-57	正常ラット	マウス CTGF		OOO	OOO	OOA		X
25-91	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OOO		X
25-101	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOA	ΔXX		X
25-256	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OXX		X
25-338	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OOO		X
25-410	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OXX		X
25-463	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OXX		X
2-228-1	正常ハムスター	マウス CTGF		OOX	OOA	OOA		O

特平 9-367699

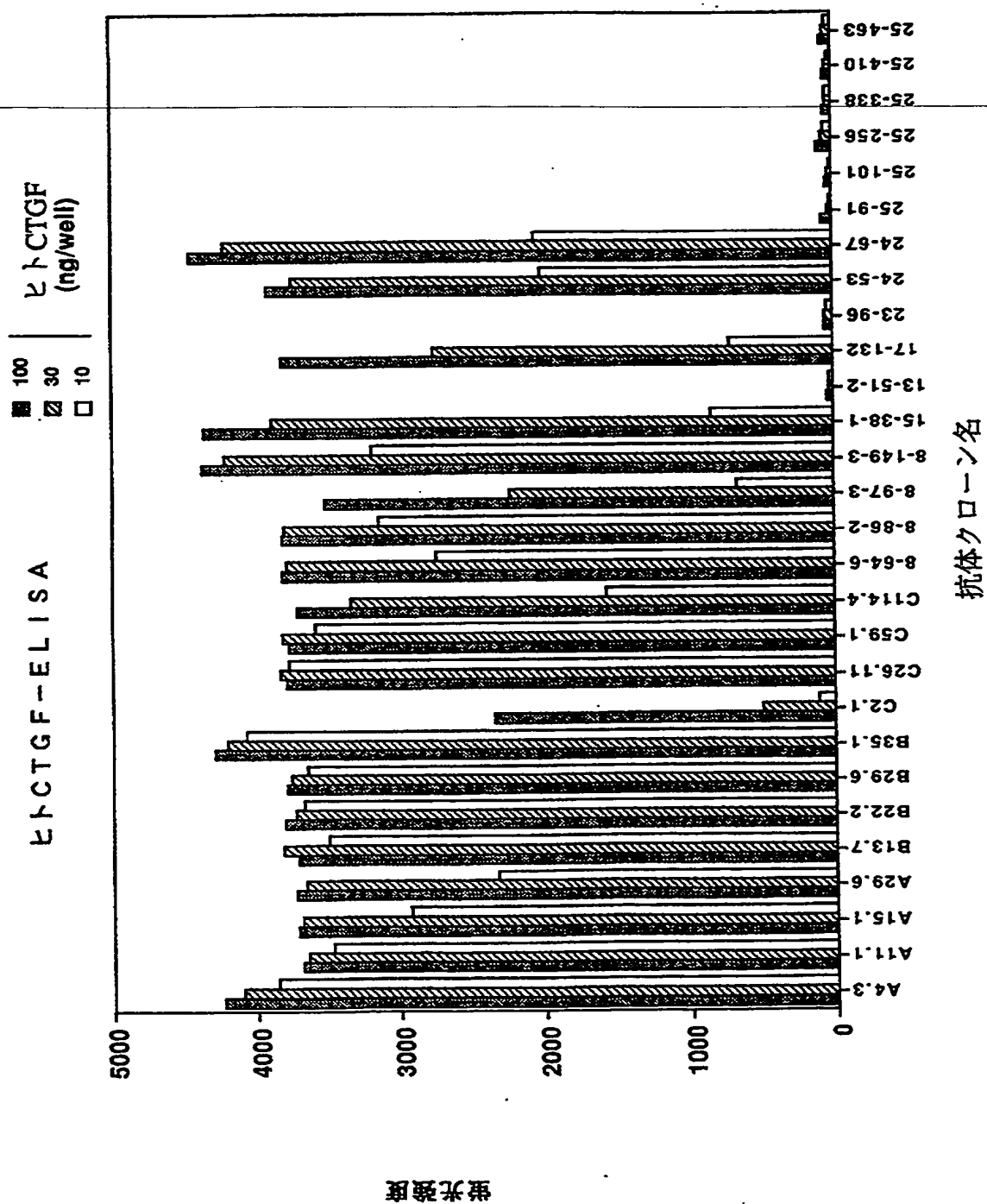
【図 2】



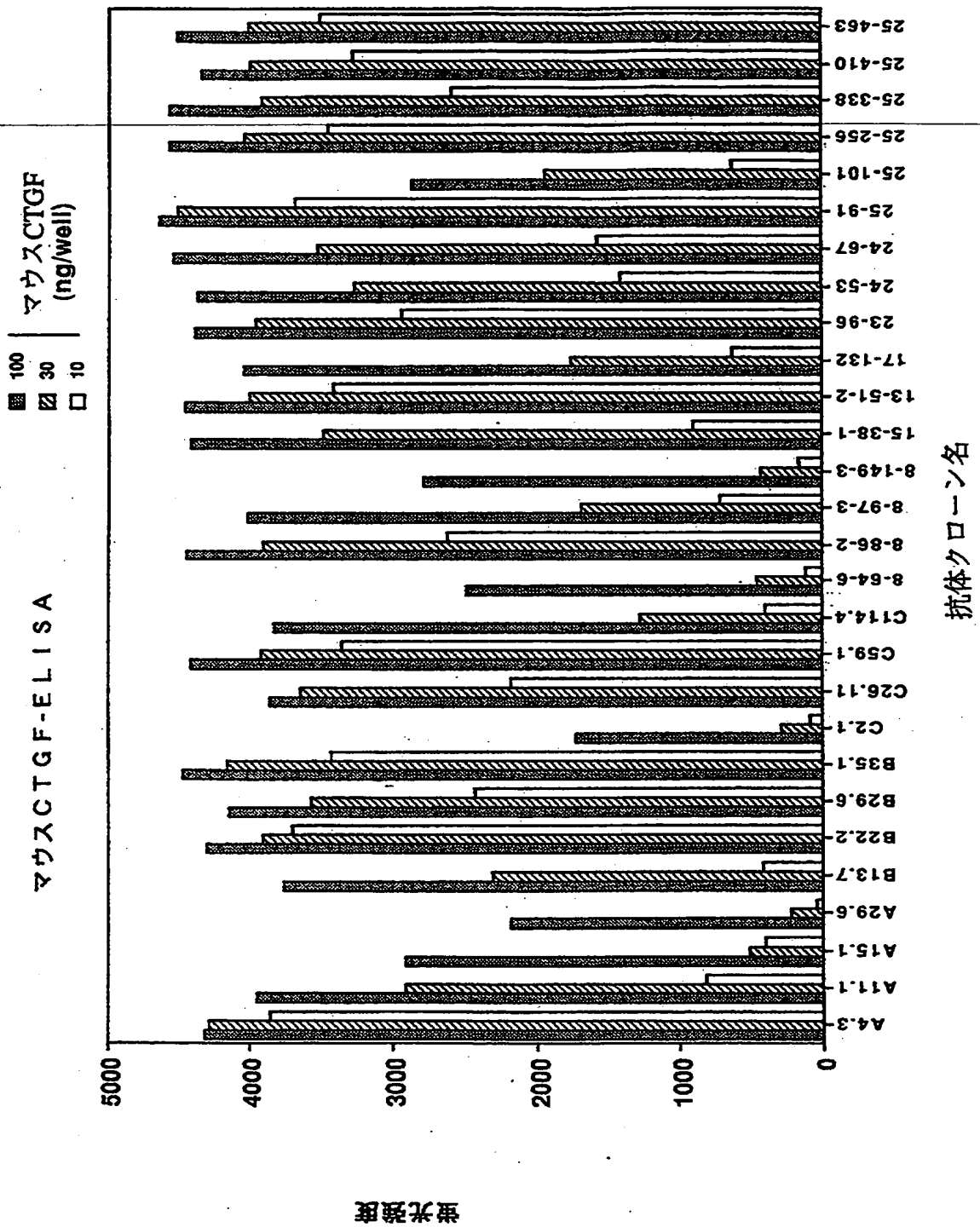
【図3】



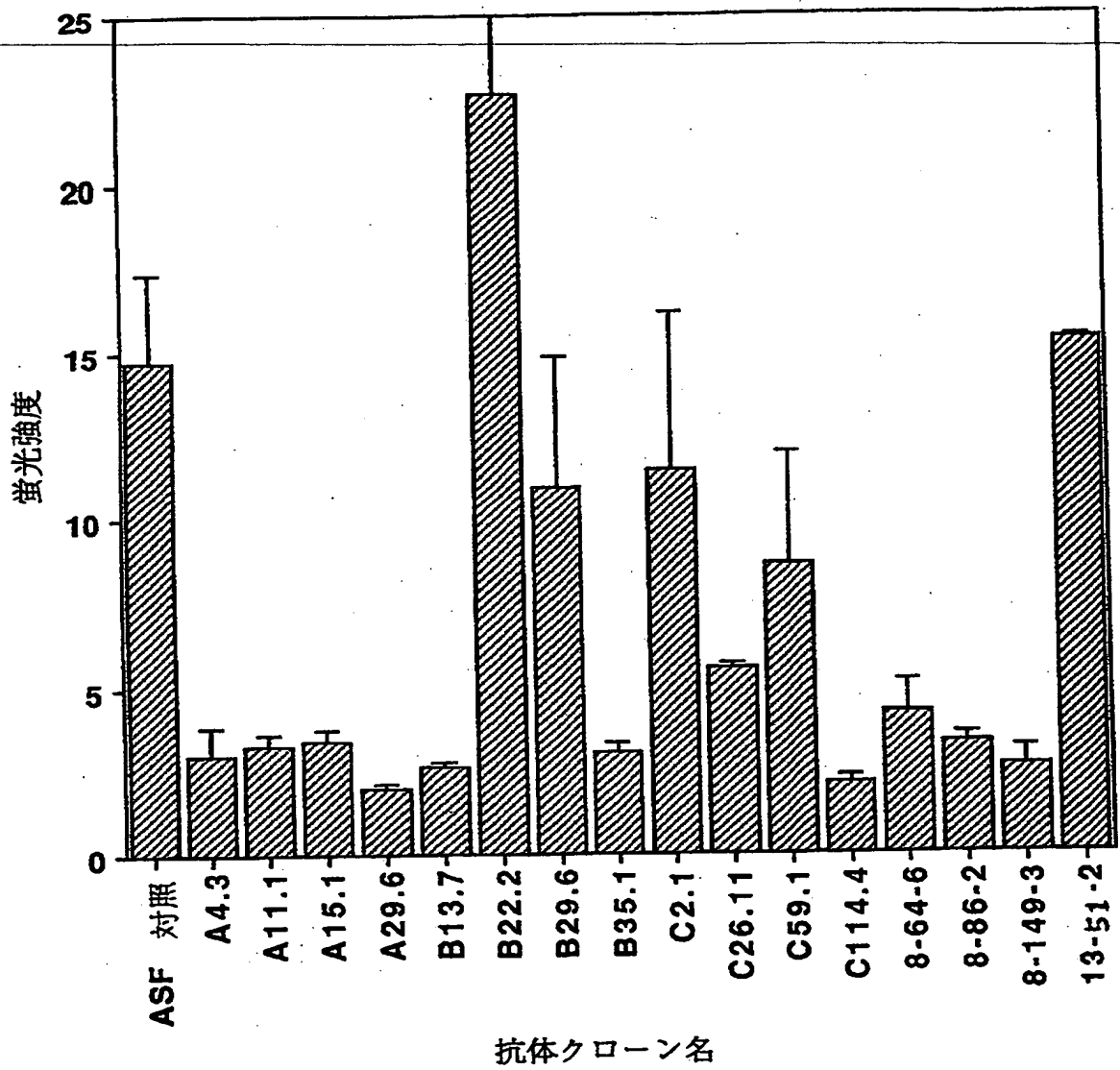
【図4】



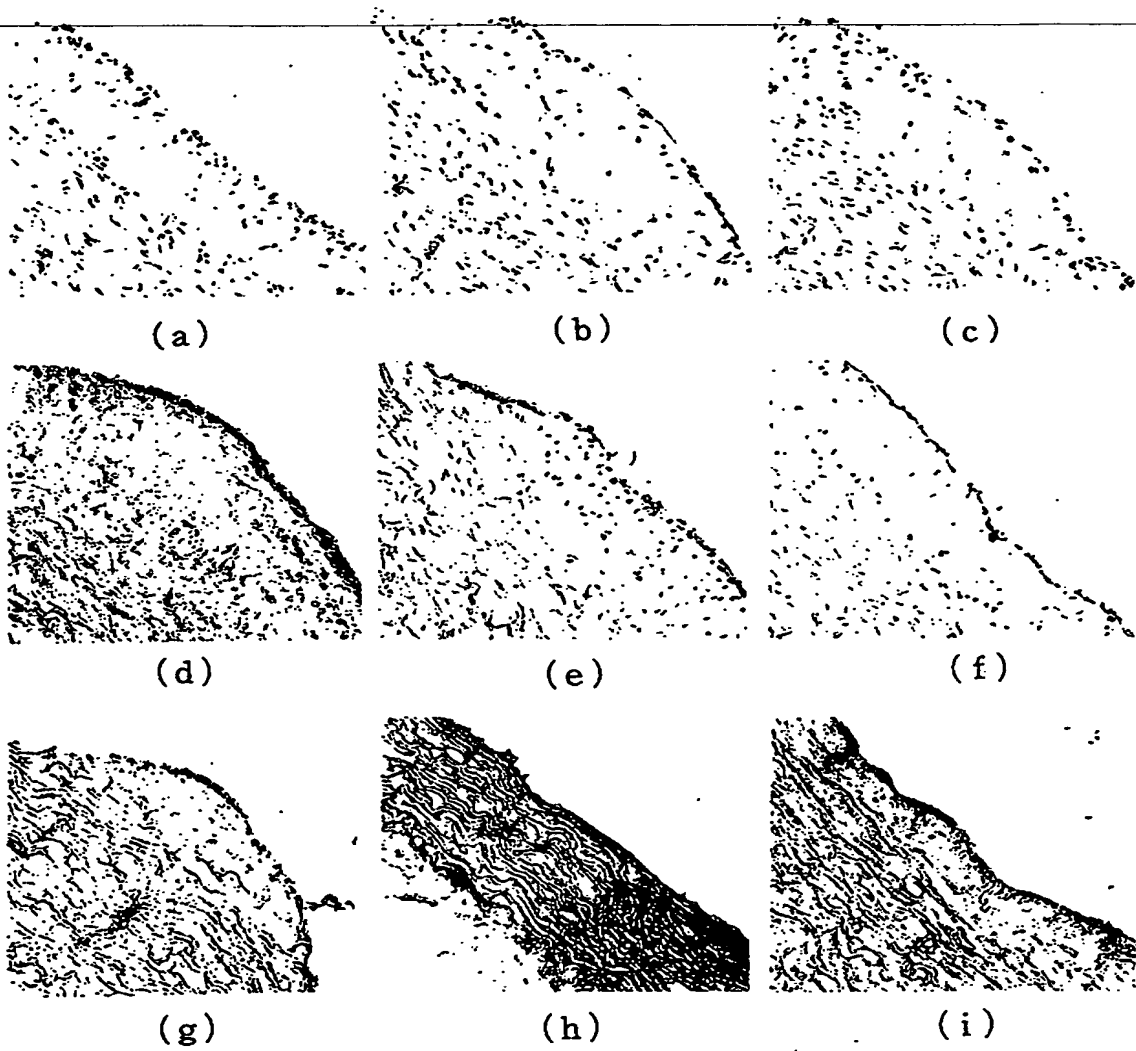
【図5】



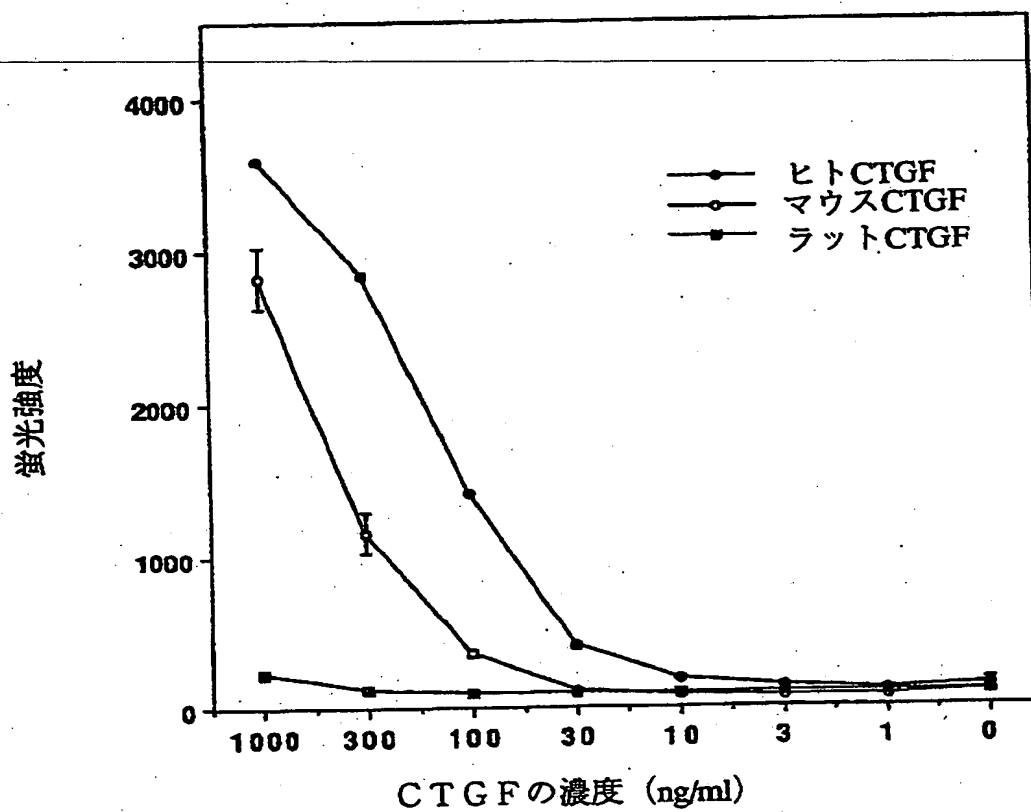
【図7】



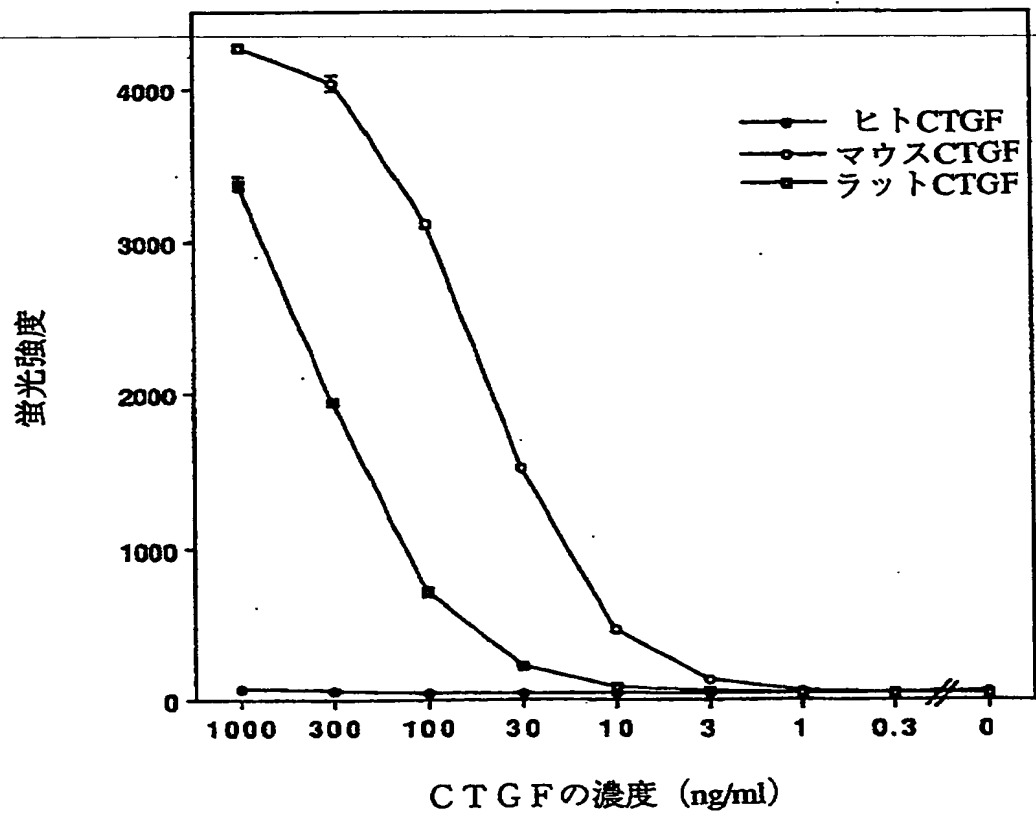
【图8】



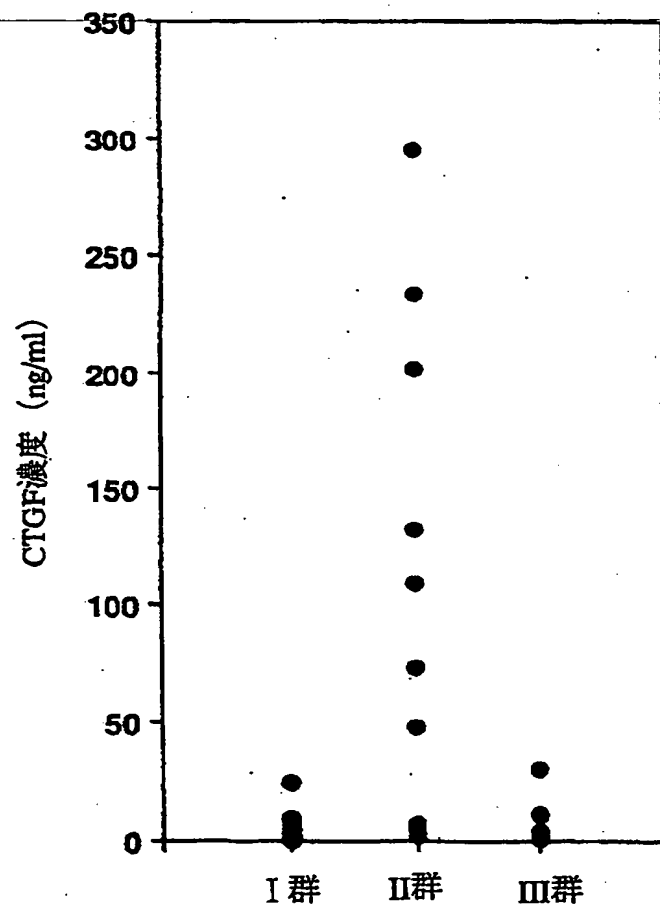
【図9】



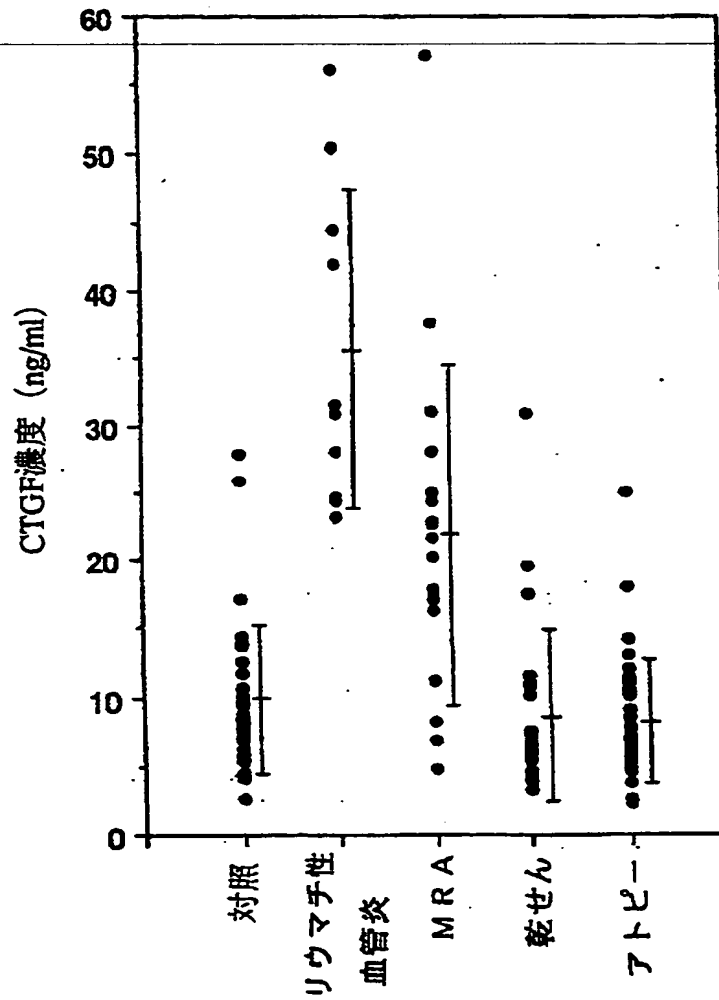
【図10】



【図11】



【図12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒト結合組織成長因子（CTGF）に起因する種々の疾患の治療、並びに該疾患に罹患している哺乳動物の体液中のCTGFの検出及び定量において有用な種々の哺乳動物の結合組織成長因子（CTGF）に対する種々の特性を有する種々のモノクローナル抗体を提供するものである。

【解決手段】 ヒト、マウス及びラットに由来する各々の組換えCTGFを、マウス、ラットまたはヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫することにより、抗原特異性、抗原親和性、中和活性及び交叉反応性等の性質の点で、異なる特性を有する該各々のCTGFに対する種々のモノクローナル抗体を調製した。とりわけ、ヒトCTGFに対するヒト抗体は、免疫拒絶反応等の副作用を惹起することのない抗体医薬品として極めて有用である。また、本発明の種々のモノクローナル抗体を用いた種々のイムノアッセイにより、種々の哺乳動物の体液中のCTGFを簡便かつ高感度で定量することが可能である。

【選択図】 なし

特平 9-367699

国際様式 INTERNATIONAL FORM



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 日本たばこ産業株式会社
代表取締役社長 水野 勝

寄託者

あて名 〒 105
東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

殿

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) PBJT-CL-12	(受託番号) FERM BP- 6208
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 12 月 18 日 (原寄託日) に受領した 1 種の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 種の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology 名称: 生命工学研究所 所長 大野 昌 Dr. Shunichi Ohno, Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 9 年 (1997) 12 月 18 日	

国際様式 INTERNATIONAL FORM



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 日本たばこ産業株式会社
代表取締役社長 水野 勝

寄託者

あて名 〒 105
東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

殿

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) PBJT-CL-13	(受託番号) FERM BP- 5209
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 12 月 18 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology 所長 大峯 信 Dr. Shinobu Ohtsuka Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 9 年 (1997) 12 月 18 日	

特平 9-367699

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000004569
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
【氏名又は名称】	日本たばこ産業株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100100217
【住所又は居所】	大阪府高槻市紫町1番1号 日本たばこ産業株式会 社 医薬総合研究所
【氏名又は名称】	大東 輝雄
【提出された物件の記事】	
【提出物件名】	原寄託についての受託証 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004569]

1. 変更年月日 1995年 5月16日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
氏 名 日本たばこ産業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)